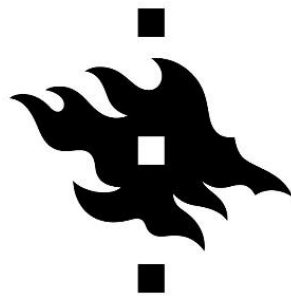


MCF 10A:n polarisaatio ja alveolin muodostus

nanokuituselluloosageelissä (NFC)

sekä NFC – soluväliaineproteiini -yhdistelmäympäristössä



Pro gradu -tutkielma

Johanna Niklander

Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet 2018

Helsingin Yliopisto / Helsingfors Universitet / University of Helsinki

Tiedekunta		Laitos
Farmasian laitos		Farmaseuttisten biotieteiden osasto
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Perinnöllisyystieteiden osasto
Tekijä		
Kirsti Johanna Niklander		
Työn nimi		
MCF 10A:n polarisaatio ja alveolin muodostus nanokuituselluloosageelissä (NFC), sekä NFC – soluväliaine proteiini -yhdistelmäympäristössä		
Oppiaine		
Perinnöllisyystiede / Kehitysbiologia		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Pro gradu -tutkielma	11/ 2018	90, josta liitteitä s. 70-90
Tiivistelmä		
<p>Tämä tutkimus esittelee kasviperäisen nanokuituselluloosageelin (NFC; GrowDex®) arvioinnin kolmiulotteisena (3U) kasvualustana rintarauhasen organogeneesin mallinnuksessa. Tutkimuksen tavoitteena oli tarkastella kasviperäisen <i>in vitro</i> -kasvualustan aiheuttamaa solusäätelyä normaalissa rinnan epiteelisessä solulinjassa, sekä selvittää rintakudoksen rauhasrakenteiden muodostumisessa keskeisen laminiini 111:n (LAM-111) alustaan lisäyksen mahdollisia hyötyjä viljelmille.</p> <p>Tutkimuksen koeasetelmassa NFC:n edustamaa kasvunicheä arvioitiin ihmisen rintaepiteelistä eristetyillä -ja tyvikalvon proteiini-kontaktien säätelystä riippuvaisella MCF 10A -solulinjalla. Solujen <i>in vitro</i> -nicheympäristön verrokkimallinnuksessa hyödynnettiin epiteelisen tyvikalvon proteiiniympäristöä edustavaa proteiinirikasta Matrigel™-2,5U -kasvualustaa. Viljelynäytteistä tehtiin aikapisteittäin valomikroskooppiset -sekä histologiset hematoksyliini – eosini (HE) morfologian arvoinnit, e-kadheriinin, vimentinin ja β4-integriinin ilmentymisten vasta-aine-analyysit, sekä β1-integriinin, Bim:in ja c-FLIP-L:n lähetti-RNA:n reaaliaikaiset PCR-analyysit. Analyysissä keskityttiin tarkastelemaan rintarauhasen epiteelin polarisointitapahtumassa havaittavaa solusäätelyä ja proteiinien eriytystä.</p> <p>LAM-111 -lisän havaittiin edistävän jossain määrin NFC:ssä viljeltyjen sferoidien sisä morfologian kavitaatiota sekä eritettujen proteiinien sijoittumista sferoidien pintarakenteisiin Matrigel™ -kontrollinäytteiden kaltaisesti, muttei yksinään riittänyt tuottamaan Matrigel™ :ssä havaittua viljelmien homogeenisyyttä. Kokeen natiivi-NFC:ssä sekä NFC-LAM-111:ssä kasvaneiden sferoidien PCR-analyysissä havaittiin polarisaatiotapahtumaan liittyvää solusäätelyä viljelmien loppuvaiheessa päivänä 28, poiketen vastaavan PCR -profiilin ilmentymisestä Matrigel™ -viljelmissä jo päivänä kolme. NFC -olosuhteissa havaittiin myös Matrigel™ -viljelmistä puuttuvia ylimääräisiä, epiteelisiltä vaikuttavia rakenteita, joiden määrittäminen vaatii lisätutkimuksia.</p> <p>NFC todettiin jäykkyyden suhteen helposti muokattavaksi sekä mahdollisesti kudoksen mekaanisia ominaisuuksia jäljitteleväksi 3U -kasvualustaksi. Tämän kokeen tuloksien perusteella muokkaamatonta NFC:tä voidaan ehdottaa soveltuvaksi kasvualustaksi tyvikalvoproteiinien säätelyä riippumattomille solutyypeille, sekä solutyypeille, jotka kykenevät tuottamaan ympärilleen oman kudostyyppillisen proteiiniympäristönsä. Kliiniseen käyttöön kelpuuttavat standardivaatimukset täyttävä NFC vaikuttaa lupaavalta materiaaalilta räätälöitävien <i>in vitro</i> -kasvualustojen suunnitteluun, ja mahdollisesti tarjoaa rakenneosiltaan tarkasti määritellyn, xenovapaan, ja proteiinilisillä eri solutyypeille säädettävän <i>in vitro</i> -kasvunichen tulevaisuuden jatkotutkimuksiin.</p>		
Avainsanat		
Nanokuituselluloosageeli; NFC; GrowDex®, laminiini-111, kolmiulotteinen soluviljely, organogeneesi, MCF 10A, <i>in vitro</i> -mallinnus.		

”MCF 10A:n polarisaatio ja alveolin muodostus nanokuituselluloosageelissä (NFC)
sekä NFC – soluväliaine proteiini -yhdistelmäympäristössä”

Pro gradu -tutkielma 2018

Johanna Niklander

Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto

<p>Ohjaaja tai ohjaajat</p> <p>Ohjaaja; Raili Koivuniemi (FT)</p> <p>Valvojat; Biofarmaseuttiset biotieteet; Prof. Marjo Yliperttula (FT), Perinnöllisyystieteet; Prof. Juha Partanen (FT).</p>
<p>Säilytyspaikka</p> <p>Farmaseuttisten biotieteiden osasto</p>
<p>Muita tietoja</p> <p>Julkaisu on tekijänoikeussäännösten alainen. Teos luovutetaan pyydettyä tulostettavana paperiversiona. Teoksen sähköinen jakaminen on kielletty.</p>

Faculty		Department
Faculty of Pharmacy		Division of Pharmaceutical Biosciences
Faculty of Biological and Environmental Sciences		Department of Genetics
Author		
Kirsti Johanna Niklander		
Title		
Polarization and alveologenesis of MCF 10A in nanofibrillar cellulose hydrogel (NFC), and in NFC – basal lamina protein -mixture environment		
Subject		
Biology / Developmental biology		
Level	Month and year	Number of pages
Master's Thesis	11/ 2018	90, appendixes on pages 70-90



Abstract

This work presents the evaluation of nanofibrillar cellulose hydrogel (NFC; GrowDex®) as a 3D *in vitro* scaffold in human breast gland organogenesis modelling. The aim of the research was to observe what kind of cell regulation would an extracellular matrix (ECM) contact of a plant-derived material induce in normal epithelial cell line, and to investigate if an addition of laminin-111 (LAM-111); a protein typical for breast gland extracellular matrix, would benefit the culture morphology development.

NFC's representative 3D growth niche was evaluated with normal human epithelial breast cell line MCF 10A, which is known for its dependence of extracellular cues for correctly polarized growth. As a positive morphology control, MCF 10A was also co-cultured in Matrigel™ 2,5D -scaffold, that is rich in extracellular matrix proteins, and commonly considered a standard in *in vitro* ECM modelling. The polarization process -and the relating cell regulation in alveologenesis was characterized in set time points with morphological observations using light microscopy and hematoxylin-eosin cross-section stainings; with immunological analysis of the expressions and localizations of e-cadherin, vimentin, and β 4-integrin, and with quantitative PCR (qPCR) analysis of temporal Bim, c-FLIP-L and β 1-integrin messenger RNA (mRNA) expressions.

The addition of LAM-111 was found to somewhat improve the comparability between NFC-LAM-111 and Matrigel™ -cultured spheroids in terms of spheroid interior structure morphology and the localization of secreted proteins, but could not be concluded sufficient in creating similarly homogenous spheroid morphology such as observed in the Matrigel™ cultures. Both native NFC and NFC-LAM-111 -mixture cultures expressed RNA profiles relating to the polarization process on day 28, in contrast with the Matrigel™ -cultures, which produced a similar expression profile already on day 6. In addition, unknown epithelial structures were detected in both NFC -conditions -cultured spheroids but not in the Matrigel™ samples; and will require additional research for accurate definition.

NFC was found easily modifiable concerning 3D scaffold stiffness, and the results suggest the material might mimic the elasto -mechanical properties of the natural tissue. Unmodified native NFC could be considered applicable for cell lines capable of producing their own necessary growth niche proteins, and for cell lines independent of the regulation provided by the ECM environment. NFC appears as a promising base material for tailored *in vitro* growth niche design, and offers a xeno-free and well-defined 3D cell culture material for various research fields, as well as the possibility for applications suitable for clinical studies.

Keywords

Nanofibrillar cellulose hydrogel; NFC; GrowDex®, laminin-111, three-dimensional cell culture, organogenesis, MCF 10A, *in vitro* modelling.

Supervisor or Supervisors

Director; Raili Koivuniemi (Ph.D.)

Supervisors; Prof. of Dept of Biopharmaceutics; Marjo Yliperttula (Ph.D.), Prof. of Dept. of Genetics; Juha Partanen (Ph.D.).

Where deposited

Division of Pharmaceutical Biosciences

Additional information

This publication is under copyright. Publication is released upon request as a printed version. Electronical distribution of the publication is prohibited.

Sisällysluettelo

1. Lyhenteet	6
2. Johdanto	10
3. Tutkimuksen teoreettinen tausta	
3.1 Nanokuituselluloosa soluviljelyssä	13
3.2 Rintarauhasen kehitysvaiheet	14
3.2.1 Rintarauhasen kantasolut	15
3.2.2 Primäärinen rauhaspuu – esipubertaalinen rintarauhanen	16
3.2.3 Sekundääriset rakenteet - aikuisen rintarauhanen	17
3.2.4 Tertiääriset rakenteet – maitorauhanen	21
3.3. Rintakudoksen 3U -mallinnus <i>in vitro</i>	
3.3.1 Rintakudoksen 3U <i>in vitro</i> -alustan proteiineja ja fysikaalisia ominaisuuksia	23
3.3.2 MCF 10A rintarauhasen solumallina	25
3.3.3. MCF 10A 3U -ympäristössä	27
4. Tutkimuksen tavoitteet ja koeasetelma	28
5. Materiaalit ja menetelmät	
5.1. Materiaalit	29
5.2. Solulinja MCF 10A	30
5.3. 3U -viljelmät	30
5.3.1. NFC 3U -alustojen jäykkyyden arviointi	31
5.3.2 NFC:n entsymaattinen hajotus	32
5.4. Näytteiden säilöminen paraformaldehydillä	32

5.5. Hematoksyliini – Eosiini värjäykset.....	33
5.6. Immunovärjäykset.....	33
5.7. PCR -näytteiden keräys ja käsittely.....	34
5.7.1. RNA:n eristys.....	35
5.7.2. Komplementaari-DNA:n valmistus.....	35
5.7.3. PCR -alukkeet.....	36
5.7.4. Reaaliaikainen PCR -reaktio.....	36
6. Tulokset	
6.1. Käytetyn MCF 10A:n viljelymorphologia vastasi vertaisjulkaisujen kuvausta linjasta.....	37
6.2. NFC-LAM-111 sferoidien pinnoissa samankaltaisuutta Matrigel™ näytteiden kanssa.....	40
6.3. Hematoksyliini -Eosiini halkaisuvärjäyksissä havaittiin polykystisyyttä NFC viljelmissä..._	44
6.4. E-kadheriinin, vimentiinin ja $\beta 4$ -integriinin rakenteellinen sijoittuminen sferoideissa.....	46
6.5. Reaaliaikainen PCR-analyysi Bim:in, c-FLIP-L:n sekä $\beta 1$ -integriinin mRNA:n tuotoista..._	49
7. Tulosten tarkastelu	
7.1 NFC olosuhteiden sferoidien kehitys oli mahdollisesti Matrigel™:n sferoideja hitaampaa..._	52
7.2 Matrigel™ mallintaa erilaista kasvunicheä kuin NFC -olosuhteet.....	54
7.3 NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa havaittiin ylimääräisiä epiteelikerroksia.....	56
8. Johtopäätökset	58
8.1. Jatkotutkimus.....	61
9. Kiitokset	63
10. Lähdeaineisto	64
11. LIITTEET	70

1. Lyhenteet

3D (three dimensional); kolmiulotteinen

2U/3U; kaksi- ja kolmiulotteinen

ALDH (aldehyde-dehydrogenase); aldehydi-dehydrogenaasi

AREG (amphiregulin); amfireguliini, EGF -perheeseen kuuluva kasvutekijä

alfa-SMA (alpha smooth muscle actin); sileän lihaksen aktiinin alfa -tyyppi

ATCC (American Type Culture Collection); Amerikan tyyppiviljelmäkokoelma, kaupallinen solupankki *in vitro* -tutkimukseen

BCL11B (B-cell lymphoma/leukemia 11B); β -solujen lymfooma / leukemia-11B -sinkkisormiproteiini

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); β -solu-lymfooma-2 -proteiini

Bcl-xl (b-cell lymphoma-extra large); erityispitkä β -solu-lymfooma -proteiini

Bim(EL) (BCL2L11; Bcl-2-like protein 11); erityispitkä Bcl-2 -kaltaisen-proteiini-11

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); paikallisesti yhtenevästi linjautuvien sekvenssien analyysiohjelma

BMP4 (Bone morphogenetic protein 4); luun morfogeeniproteiini-4

BSA (bovine serum albumin); naudan seerumin albumiini

CALLA (Neprilysin); akuutti lymfoblastinen leukemia-antigeeni, proteiineja inaktivoiva metalloproteaasi

cAMP (cyclic adenosine monophosphate); syklinen adenosiinimonofosfaatti

CD (protein) (cluster of differentiation, cluster of designation or classification determinant); solukalvolla sijaitsevia, solusäätelyn ligandeja sitovia proteiineja

c-FLIP-L (FLICE-like inhibitory protein-L); FLICE -kaltaisen inhiboivan proteiinin pitkä variantti

CREB (cAMP response element -binding protein); cAMP:in toimintavasteen säätelyalueita (CRE) sitova -transkriptiotekijä

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); 4',6-diamidiino-2-fenyyli-indoli, DNA:ta sitova fluorofori

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); Dulbecco:n muunneltu Eagle -elatusneste

EGF (epidermal growth factor); epidermaalinen kasvutekijä

EGFR; epidermaalisen kasvutekijän reseptori

EMBL (European Molecular Biology Laboratory); eurooppalaisen molekylärisen biologian laboratoriot

EMBL- EBI (European Bioinformatics Institute); eurooppalainen bioinformatiikan instituutti

EpCAM (epithelial cell adhesion molecule); epiteelinen soluadheesiomolekyyli



ERBB3; (HER3; ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori -3); epidermaalinen kasvutekijä – tyrosiini-proteiinikinaasi-reseptori-3

Erk (extracellular signal–regulated kinase); solunulkoisen signaalin säätelemä kinaasi

FA (focal adhesion); paikallisadheesio

FAK (focal adhesion kinase); paikallisadheesiokinaasi

FCLAP (Finnish Centre for Laboratory Animal Pathology); Suomen laboratorioeläimien patologian keskus

FGF (fibroblast growth factor); fibroblastikasvutekijä

FITC (Fluorescein isothiocyanate); isothiosyanaattiryhmällä proteiineja sitova fluorofori

FLICE (caspase 8, apoptosis-related cysteine protease); kaspasi-8, kysteiiniproteaasi

GFR (growth factor reduced); kasvutekijä -vähennetty

GTPaasi; GTP -hydrolaasientsyymi

HE (hematoxylin - eosin); hematoksyliini - eosiini

HGF (hepatocyte growth factor); hepatosyyttikasvutekijä

HIF-1 (hypoxia inducible factor – 1); hypoksian positiivisesti säätelemä transkriptiotekijä-1

IGF-I (insulin-like growth factor); insuliinin-kaltainen kasvutekijä

ILK (integrin-linked kinase); integriinikinaasi

JAK/STAT5 (janus kinase/ signal transducer and activator of transcription -5); janus kinaasi / signaalin siirtäjä – transkription aktivoija-5

K (keratin); keratiini

kDa; kilodalton

cDNA (complementary DNA); komplementaari DNA

LAM-111; laminiini-111

LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton); tuman -ja solunsisäisten tukirankojen linkittäjä

log10; logaritmi 10

mRNA (messenger RNA); lähetti-RNA

MAPK (mitogen-activated protein kinase); mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi

MCF 10A; normaali ihmisen rintarauhasen epiteelinen ja fibrokystinen solulinja, adherentti (A)

MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium); maitorauhasen epiteelisolujen solukasvatusneste

MEK (mitogen-activated protein kinase kinase); MAPK:a aktivoiva kinaasiryhmä

MLCK (myosin light-chain kinase); myosiiniproteiinin kevyen ketjun kinaasi

MMP (matrix metalloproteinase); metalloproteaasi

Msx2; homeoboxi -geeniperheen tuottama transkriptiorepressori



MUC1 (mucin 1); mukiini-1

MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation); usean sekvenssin linjauksessa käytettävä ohjelma

Myc; transkriptiotekijöitä tuottava säätely- ja proto-onkogeeniperhe

NCBI (National Center for Biotechnology Information); kansallinen (USA) bioteknologian tietueiden keskus

NFC (nanofibrillar cellulose hydrogel); nanokuituselluloosageeli, GrowDex®

NFC-LAM-111; nanokuituselluloosageenin ja laminiini-111:n seos

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); b-solujen tuman kappa-tehostajatekijä

nm; nanometri

P13/AKT; phosphatidylinositiidi-3-kinaasi / proteiinikinaasi-B (” PKB, Akt ”)

Pa (Pascal), paskali

PBS-; fosfaattipuskuroitu, kalsium -ja magnesium vapaa (-) saliini

PFA (paraformaldehyde); paraformaldehydi

qPCR (quantitative polymerase chain reaction); kvantitatiivinen (reaaliaikainen) PCR -reaktio

RankL (receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand); tuman kappa-b-tekijän reseptorin aktivointitekijän ligandi

Rcf (relative centrifugal force); suhteellinen sentrifugointivoima

RefSeq (Reference Sequence database); kuratoitujen referenssisekvenssien tietokanta

RNAi (RNA interference); RNA molekyylin sitoutumisella estetty mRNA:n luenta

RPT (repel polymer technology); adheesiota hylkivä pinta

S1 (HMT-3522-S1); normaali ihmisen rintarauhasen epiteelinen solulinja

SIRPA (signal regulatory protein alpha); signaalinsäätelyproteiini – alfa

SNAI2 (SLUG); kohdegeeniensä luenta hiljentävä sinkkisormi -transkriptiotekijä

SSEA4 (stage-specific embryonic antigen 4); vaihespesifi-alkioperäinen antigeeni-4

STAT (Signal transducer and activator of transcription), signaalia välittävä transkription aktivoijatekijä

Tbx3 (T-box transcription factor 3); T-box:in transkriptiotekijä-3

TEB (terminal end bud); kasvannaisrakenteen päädyn kasvusolukko

TGF β (transforming growth factor - β); muuntava kasvutekijä - β

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling); DNA:n hajoamisen havainnointi leimatuilla nukleotideilla

um; mikrometri



v/v (volume/volume); tilavuuden suhde tilavuuteen

Wnt; konservoitunut yksilönkehitykseen ja solusäätelyyn liitetty, Frizzled – G-proteiinireseptoreita aktivoiva kasvutekijä

Xeno-; vieraslajiperäinen

YAP/TAZ (Yes-associated protein / Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif); Wnt:n negatiivisesti säätelemät Yes-proteiini / PDZ – motiivin sisältävä transkription yhteisaktivoija



2. Johdanto

Kudosten mikroympäristön ominaisuuksien jäljittely on keskeisellä sijalla nykyisten kehitysbiologian ja lääketutkimuksen *in vitro* -mallien suunnittelussa. Viljelyalustojen tuotekehittelyn ajavina voimina toimivat erityisesti esiklinisten *in vitro* -lääkemallien biologisen rinnastettavuuden parantaminen kliinisten koesarjojen kanssa, sekä terapeuttisten siirrännäisten luotettavampi tuottaminen (Hay ym. 2014, Härmä ym. 2010, Dimmeler ym. 2014). Keskimääräisesti noin 10% kehitetyistä lääkkeistä päätyy valmistukseen kymmenen vuoden kliinisen arvioinnin jaksolla, jossa suurin karsinta tapahtuu hoidon tehokkuutta arvioivassa II -vaiheessa (Hay ym. 2014). Alustavien *in vitro* -tutkimusten jälkeen kokeellisten lääkkeiden kelpoisuus kliinisiin tutkimuksiin arvioidaan lisäksi eläinmalleilla, jotka ovat kalliita, vaativat erityiskoulutusta ja saattavat tuottaa tulkinnanvaraisia tuloksia johtuen lajien välisistä homeostaasin eroavaisuuksista säätely- ja systeemitasoilla (Hay ym. 2014, Pasic ym. 2011, Perel ym. 2007). Ihmisen kudostympäristöä onnistuneesti mallintavien viljelyalustojen kehitys mahdollistaisi paitsi eläinkokeiden vähentämisen, myöskin kasvavan investoinnin mallinnuksen tutkimuksiin kalliiden epäonnistumisten vähentyessä.

Keinotekoista kasvualustaa suunniteltaessa on huomioitava missä määrin mallintava solulinja tuottaa itse tarvitsemiaan tekijöitä kasvuympäristöönsä, ja millaisia tekijöitä on tarpeellista tarjota toivotun kehityksen tai koemallin aikaansaamiseksi. Solun ja tyvikalvoproteiinien säätelysuhdetta on havainnollistettu muun muassa ihmisen kantasolujen erilaistamisen tutkimuksissa. Elatusnesteiden kasvutekijöihin nojautuvan erilaistamisprosessin edetessä on kantasoluista muodostuvissa esiastesoluissa havaittu integriinien alatyypin vaihtelua eri solutyypin erilaistumisvaiheiden välillä, mikä havainnollistaa solun ja kasvuympäristön proteiinikontaktien vaihtelua varhaisen yksilönkehityksen aikana. Maksan kudostyyppisiä proteiineja on lisäksi hyödynnetty kaksisolotteisen (2U) kasvualustan pinnoitteena ohjattaessa kantasoluista kemiallisesti erilaistettuja endodermisoluja maksan solukon kehityssuuntaan, jolloin alustan proteiinien on havaittu osallistuvan kudostyypin kehitysvaihe -tyyppisten proteiinien tuoton edistämiseen viljelmissä (Kanninen ym. 2016).

Proteiinien tarjoamien säätelykontaktien lisäksi myös kasvualustan jäykyyden ja kolmiulotteisuuden (3U) on havaittu vaikuttavan solujen käyttäytymiseen (Butcher ym. 2009, Le Beyec ym. 2007). Solun omaksuessa luonnollista kudosta vastaavan 3U -muodon, solukalvon reseptorit ja solunsisäinen

aktiinirunko järjestäytyvät uudelleen ja muuttavat säätelemiensä kinaasien signalointiketjujen toimintaa. Aktiinirunko välittää mekaanisia ärsykeitä myös tuman kromatiinia sitovalle lamiiniverkostolle, muuttaen näin kromatiinin konformaatiota ja histonien asetylaatiokuvioita (*Butcher ym. 2009, Le Beyec ym. 2007, Uzer ym. 2016*).

2- ja 3U -kasvu ympäristöjen välisiä eroavaisuuksia soluvasteissa on havainnollistettu useissa vertailevissa tutkimuksissa. Syöpälääkkeen altistuskokeissa 3U-Matrigel™:n on havaittu mahdollistavan erilaisen soluvasteen phosphatidylinosiidi-3 -kinaasi / proteiinikinaasi-B:n (PI3/AKT) signalointireiteissä, verraten 2U-muovialustan viljelmiin (*Härmä ym. 2010*). Matrigel™-3U -ympäristössä viljelmien havaittiin myös nostavan lipidimetaboliaansa, kromatiinin muunteluun ja säätelyalueiden uudelleenohjelmointiin liittyvien geenien ilmentämistä, ja etenkin metastaivien linjojen kohdalla, invaasioon ja epiteeli-mesenkyymi siirtymään liittyvien geenien ilmentämistä (*Härmä ym. 2010*). Siirryttäessä 2U -ympäristöstä solut sisällään pitävälle 3U -alustalle, ympäristön ja solujen jäykkyysarvot myös madaltuvat muistuttamaan luonnollista kudostyyppistä, minkä on havaittu hidastavan joidenkin solutyyppien jakautumista (*Alcaraz ym 2008, Härmä ym. 2010*). Lisäksi, 3U -alustan mahdollistaman polarisoitumisen seurauksena 3U -viljelmissä tapahtuu myös rakenteellista tehtävänjakoa, minkä ansiosta esimerkiksi rintarauhasperäinen epiteelisolukko kykenee erittämään kudostyyppillisiä proteiineja, sekä laskemaan 2U -viljely-ympäristössä havaittua tyvikalvon proteiinien ylituottoa (*Alcaraz ym. 2008, Streuli ja Bissell 1990*).

Uuden 3U -kasvualustan suunnittelu ja arviointi in vitro -käyttöön

Todennäköisesti tunnetuin ja menestyksekkäin kaupallinen *in vitro* -kasvualusta on hiiren sarkoomakasvaimesta eristetty Matrigel™ -geeli, joka tarjoaa viljelmille laajan kirjon epiteelien tyvikalvolle tyyppillisiä kontaktiproteiineja, sekä myöskin mahdollisuuden kolmiulotteiseen kasvuun (*BD Biosciences*). Useimpien eläinperäisten materiaalien tutkimuskäyttö on kuitenkin usein ongelmallista niiden eläinperäisyydestä johtuvan valmistuserien laadullisen vaihtelun vuoksi sekä materiaalien sisältämien tunnettujen -ja mahdollisten tuntemattomien kasvutekijöiden vuoksi.

Eläinperäisen aineksen puuttuminen *in vitro* -koeasetelmista on toivottavaa tuntemattomien kasvutekijöiden ja valmistuserien välisen vaihtelun minimoimiseksi, ja on usein edellytyksenä

tuotteen kliinisissä sovelluksissa. Eläinperäisen materiaalin puuttuminen tuo ilmeisten etujen lisäksi kuitenkin myös ylimääräisiä haasteita materiaalien soveltamisessa eläinsoluille, jotka ovat tiiviissä vuorovaikutuksessa kudossympäristönsä kanssa ja hyödyntävät ympäristöstään tunnistamiensa proteiinien kontakteja toimintansa ohjaamisessa. Uusien soluviljelyyn sovellettavien materiaalien kartoituksessa onkin kiinnitettävä erityistä huomiota, millaista säätelyä materiaalin kontaktipinta tarjoaa soluille, millaista kompensoivaa säätelyä solut mahdollisesti joutuvat ympäristössään ilmentämään, ja miten soluille tuntematon kontaktiympäristö mahdollisesti vaikuttaa koeasetelmaan.

Tässä pro gradu -työssä arvioitiin kasviperäisen nanokuituselluloosan (NFC) soveltuvuutta normaalista epiteelisolukosta muodostuvien polarisoituneiden 3U -rakenteiden mallinnuksen tutkimuksiin. Ei -eläinperäisestä alkuperästään johtuen NFC arvioitiin soluväliaineproteiini-köyhäksi materiaaliksi, minkä vuoksi tutkimus keskittyi erityisesti arvioimaan NFC:n soluille tarjoamaa biologista kontaktipintaa sekä NFC:n mahdollista potentiaalia proteiinilisillä muokattavana *in vitro* -kasvualustana.

NFC:n soluille edustamaa -ja oletettavasti tuntematonta 3U -kasvunicheä arvioitiin tyvikalvon kontakteista riippuvaisella rinnan epiteelisellä MCF 10A -solulinjalla, jota viljeltiin lisäksi positiivisena verrokkiolosuhteena tyvikalvoproteiineja runsaasti sisältävässä Matrigel™ 2,5U -alustassa. NFC:n potentiaalia proteiinilisillä räätälöitävänä kasvualustana arvioitiin rinnan rauhasepiteelin pohjakuorelle tyypillisen lamiiniini-111:n (LAM-111) ja NFC:n seoksessa kasvaneilla viljelmillä.

Analyyseissä keskityttiin MCF 10A:n polarisoitumisprosessissa yleisesti havaittujen lähetti-RNA:n ja proteiinien erityksen arvointiin sekä viljelmien solukasvannaisten sisärakenteiden muodostumisen arvointiin. Olosuhteiden välillä havaittuja eroavaisuuksia verrattiin MCF 10A:sta sekä Matrigel™:stä julkaistuihin tutkimuksiin, pyrkien yksilöimään tuloksissa havaittujen eroavaisuuksien syitä kokeellisissa NFC -kasvualustoissa. Työ tarjoaa tapauskohtaisen esimerkin 3U-*in vitro* -mallien suunnittelussa esiintyvistä tulkinnanvaraisista näkökulmista valitun solulinjan ja kontrollien valinnan suhteen, sekä demonstroi kasvatusalustan mekaanisten ominaisuuksien ja proteiinikontaktien mahdollisia vaikutuksia rinnan epiteelisen solulinjan kasvulle.

3. Tutkimuksen teoreettinen tausta

3.1 Nanokuituselluloosa soluviljelyssä

Nanokuituselluloosa; kaupalliselta nimeltään GrowDex®, on UPM Kymmene:n patentoima kasviperäinen, nanokuituisesta puusellusta ja vedestä valmistettu geeli. NFC ei sisällä eläinsolujen tunnistamia biologisia rakenteita, eikä näin ollen edusta mitään kehon tyvikalvon tyyppiä kontaktipinnaltaan. NFC-3U -viljelmien morfologian kehitys on riippuvaisia elatusnesteeseen tai viljelyalustaan lisätyistä proteiineista, sekä solujen omasta kyvystä tuottaa soveltuva bioaktiivinen kasvuniche.

NFC:llä on useita hyödyllisiä ominaisuuksia 3U -soluviljelysovellusten kannalta, kuten materiaalin varauksettomuus ja reagoimattomuus, eläinperäisten tekijöiden puuttuminen, geelin jäykkyyden muokattavuus laimentamalla, geelin huokoisuus ja läpäisevyys, materiaalin täydellinen poistettavuus näytteestä, sekä geelin rakenteen riippumattomuus vallitsevasta lämpötilasta (*Bhattacharya ym. 2012, Lou ym. 2014*). Geeli soveltuu kertaluontoiseen sterilointiin autoklavoinnilla (*UPM Kymmene, Suomi*).

Geeli rakentuu irrallisista ja satunnaisia kimppuja muodostavista selluloosakuiduista, minkä vuoksi geeli sallii rajoittamattomasti viljelmän rakenteiden kasvua, materiaalin sekoittamista, tai esimerkiksi pipetointia ruisku - neula -yhdistelmällä (*Bhattacharya ym. 2012, Lauren ym. 2014*). Elektronimikroskopian analyyseissä NFC:n kuitujen pienimmäksi halkaisijaksi on arvioitu 7 nm, ja keskimääräiseksi halkaisijaksi 20-30 nm. Geelin diffuusioympäristön arviointi 20-, 70- ja 250 kDa:n FITC -dekstraaneilla viittaa 0,5% NFC:n muistuttavan luonnollisten kudosten proteiinien diffuusioympäristöä (*Bhattacharya ym. 2012*). Lisäksi 3U -tutkimuksissa on havaittu, että solut nykivät aktiivisesti kasvuympäristöään havainnoidessaan ympäristönsä elastisuutta, ja että seinistä irrallaan oleva, kelluva 3U -kasvualusta tarjoaisi tietyille solutyypeille edistyneemmän niche -ympäristön (*Dhimolea ym. 2010*). NFC:n kelluessa irrallaan viljelyastian seinästä tarjoaa geeli poikkeuksellisesti periksi antavan ja joustavan kasvualustan soluille.

NFC on todettu soluviljelyyn soveltuvaksi aikaisemmissa syöpä- ja kantasolulinjojen 3U -viljelymalleissa, joiden pääpainoina olivat materiaalin toksisuuden arviointi, kasvualustan

mekaanisen tuen tuottaman kasvumorfologian havainnointi, sekä soluviljelyyn soveltuvan diffuusioympäristön arvioiminen (*Bhattacharya ym. 2012, Lou ym. 2014*). Materiaalia on testattu ihmisen alkioeräisillä kantasoluilla, ihmisen maksan HepG2 ja HepaRG -syöpälinjoilla, sekä aggressiivisesti metastoivalla ihmisen melanoomalinjalla MUG-Mel2 (*Lou ym. 2014, Bhattacharya ym. 2012, Malinen ym. 2014, Rinner ym. 2017*). Edellä mainittujen koeasetelmien mallinnuksessa käytettyjä solulinjoja kuitenkin yhdistää niiden normaaleista ja somaattisista solutyypeistä vaihtelevasti poikkeava käyttäytyminen 3U -ympäristössä. Ihmisen pluripotenttien kantasolujen NFC -viljelyssä käytettiin voimakkaasti erilaistumattomuutta ylläpitävää -ja näin myös jossain määrin soluvastetta hiljentävää elatusnestettä, ja etenkin metastoivat syöpälinjat kantavat usein mutaatioita solu-tyvikalvon signaalintiketjujen ja kasvun rajoittamisen geeneissään. Esimerkkinä tyvikalvon tarjoaman säätelyn väistämisestä on hepaattisten karsinomalinjojen kyky välttää anoikisprosessi anti-apoptoottisten signaalintiketjujen ylliedustuksella (*Fabregat 2009, Whelan ym. 2010, Härmä ym. 2010*). Johtuen edellä mainittujen linjojen normaaleista ja somaattisista soluista poikkeavasta säätelystä sekä aiempien kokeiden keskittymisestä pääosin NFC:n kykyyn ylläpitää elinkykyistä soluviljelmää tai kykyyn toimia kudostyyppillisten toiminnallisten piirteiden synnyn mahdollistavana 3U alustana; NFC:n soluille edustamaa biologista kontaktipintaa ei ole nimenomaisesti arvioitu aikaisemmissa *in vitro* -tutkimuksissa.

3.2. Rintarauhasen kehitysvaiheet

In vitro -mallinnuksessa käytetyn solutyypin luonnollisen kehityskaaren tunteminen on tarpeellista ymmärtääkseen linjan 3U -ympäristön vaatimukset sekä linjan valmiudet sopeutua kasvu ympäristöönsä. Tutkimuksen mallinnuksessa käytetty MCF 10A -solulinja on eristetty rintarauhasen epiteelistä, jonka soluväliainematriisi koostuu rasvakudoksesta, fibroblasteista, makrofaageista, eosinofiileistä, kollageeni-I -ja III -tyypeistä, hemidesmosomikollageeni-XVII:tä (BP180), tenasciineista ja proteoglykaaneista. Rauhasepiteeli koostuu luminaali -epiteelisistä, basaali-myoepiteelisistä, sekä kasvuhaarojen päätyjen solutyypeistä. Rinnan epiteelinen tyvikudos koostuu pääosin laminiinityypeistä 111 (I), 332 (V), 511 (X) ja 521 (XI), kollageenityypeistä IV ja VII, sekä nidogeeni-I:tä (*Macias ja Hinck 2012, Muschler ja Streuli 2010*).

Naispuolisen rintarauhasen kehitys on nelivaiheinen käyden läpi primäärisen rintarauhasen muodostumisen, sekundääriseen puurakenteen haaroittumisen, sekä tertiääristen alveolisilmujen muodostuksen. Imetyksen päätyttyä rauhaskudos läpikäy involuutioksi kutsutun eritysepiteelien surkastumisen (*Macias ja Hinck 2012*).

3.2.1 Rintarauhasen kantasolut

Ihmisen rintarauhasen *ex vivo* -transplantaatio, -linjanjäljitys -ja vasta-aine -tutkimukset viittaavat yhden kantasolupopulaation ja kolmen kudosesiasteisen solupopulaation läsnäoloon aikuisen rintarauhasessa (*Villadsen ym. 2007, Shehata ym. 2012, Stingl ym. 2001*). *In situ*-vasta-aine -analyysien perusteella kantasolujen sijainniksi on ehdotettu tiehyiden rauhasen solukkoa ja esiaasteisten solutyypin sijainneiksi maitorauhasen lohkojen rakenteita. Tiehyiden kantasolujen jakautumisen aktiivisuus on havaittu vähäiseksi verrattuna rauhaslohkojen alkiooperäisen aktiivisuuteen *in situ* (*Villadsen ym. 2007*).

Solulinjojen perustamisvaiheessa tiehytperäisten, kantasoluiksi arvioitujen solujen havaittiin omaavan korkeamman uudistumiskyvyn 2U -ylläpitoviljelmissä, ilmentävän luminaalista keratiini-19:ta (K19) ja basaalista keratiini-14:ta (K14) yhdestä solusta tuotetussa populaatiossa, sekä kykenevän neljästä yksilöidystä epiteelisestä solutyypistä ainoana muodostamaan kaikkia rauhaspuun rakenteita 3U -viljelmissä (*Stingl ym. 2001, Villadsen ym. 2007*).

Kolmen eri kartoitustutkimuksen perusteella rintarauhasen kantasolukon tyypillisesti ilmentämät proteiinit olivat epiteelinen soluadheesiomolekyyli (EpCAM), integriini alfa-6^(korkea), aldehydi-dehydrogenaasi (ALDH), K19 ja K14, sekä hyvin heikosti ilmentyvä tai puuttuva estrogeenireseptori. Yksittäisten tutkimusten lisähavaintoja olivat vaihespesifi alkiooperäinen antigeeni-4:n (SSEA-4), keratiini-6a:n (K6a) ja keratiini-15:n (K15) ilmenemiset *in situ*, positiivinen maidon rasvaglobuliinin ilmentyminen, mahdollisesti positiivinen basaalisien metalloproteaasi CALLA -proteiinin ilmentyminen, hyvin heikot LAM-111:n ja tenasciinin ilmentymiset, heikko mukiini-1:n (MUC1) ilmentyminen, sekä puuttuva epidermaalisen kasvutekijän tyrosiini-proteiinikinaasireseptori-3:n (ERBB3) ilmentyminen (*Villadsen ym. 2007, Shehata ym. 2012, Stingl ym. 2001*). Rintaepiteelin

kantasolupopulaatiota ylläpitäviksi kasvutekijöiksi on ehdotettu SNAI2 ja BCL11B -transkriptiotekijöitä, joka estävät luminaalisen ja basaalisen linjan määräytymistä (*Miller ym. 2018*).

Kahdessa erillisessä 3U-*in vitro* -tutkimuksessa kaikki esiasteiseksi arvioidut solutyypit kykenivät muodostamaan 50-100 µm kokoisia, lumenin sisältäviä sferoideja 3U-Matrigel™ -alustalla, mutta eivät tiehyiden rakenteita sisältäviä organoidikasvannaisia (*Shehata ym. 2012, Villadsen ym. 2007*). 2U-primääriviljelmien edetessä myoepiteelisen linjan spontaanin määräytymisen havaittiin lisäksi dominoivan solupopulaatiossa. Kaikkiaan, esiasteisten solujen pääteltiin sijaitsevan lähempänä epiteelin basaalista kuin luminaalista kerrosta (*Stingl ym. 2001*).

Kolmessa esiasteisessa solutyypissä on havaittu hyvin vähäistä SSEA-4:n ilmentämistä, jakautuville epiteelisoluille tyypillistä laminiini-alfa-2/4:n ilmentämistä, sekä joko keratiinityyppien 19 tai 14:n, tai molempien puuttuvaa ilmentymistä. Esiastesoluista MUC1:ä ilmentävät solut edustivat tulevien lohkorauhasten luminaalisia epiteelilinjoja kahdella tyypillisellä ilmentämisprofiililla: K19, E29, BCA-225, EpCAM^(matala), estrogeenireseptori^(korkea), sekä K8 ja CDw75, EpCAM^(korkea). Thy1:tä ilmentävät solut edustivat myoepiteelisiä linjoja joko lohkojen rauhasissa (K14, Wt1^(korkea), LAM-111^(korkea), tenascin^(korkea)), tai tiehyissä (K14, K17^(korkea), LAM-111^(korkea), tenascin^(korkea)) (*Villadsen ym. 2007*). Muita havaittuja esiasteista solulinjaa määrittäviä profiileita olivat luminaalisen linjan EpCAM^(positiivinen) / alfa-6^(negatiivinen), ja myoepiteelisen EpCAM^(negatiivinen) / alfa-6^(positiivinen) proteiinien ilmentämiset (*Stingl ym. 2001*).

3.2.2 Primäärinen rauhaspuu – esipubertaalinen rintarauhanen

Rintarauhasen varhaiskehitys on sukupuolihormoneista riippumatonta, ja alkaa ektodermaalisen plakodin juurtumisesta rinnan tukikudokseen. Prosessia kaavoittaviksi tekijöiksi on havaittu mm. toisiaan inhiboivien epiteelisen luun morfogeeniproteiini-4:n (BMP4) ja mesenkymaalisen Tbx3:n signalointia, jossa Tbx3 lisäksi ylläpitää plakodisilmun kasvua ja haaroittumista ajavaa Wnt:n ilmentämistä. Kasvavan plakodisilmun erittämä paratyroidihormoni muokkaa ympäröivää mesenkyymiä primääristä rauhaspuuta varten mm hiustupen kasvua estävän Msx2:n, sekä mesenkyymiin siirtämänsä Wnt:n ilmentymisen välityksellä. Valmiissa primäärisessä esirauhasessa on tulevan rintarauhasen tyvihaarat, rintarauhasen mesenkyymi, nännipihat, sekä ontot tiehytontelot,

joiden päissä on heterogeeninen rauhassolukko (*Macias ja Hinck 2012*). Primäärisessä kehitysvaiheessa epiteelinen tyvikalvo sisältää alfa-3 -laminiineja, IV- ja VII -kollageenia, ja rauhasepiteeli ilmentää $\alpha 6 \beta 1$ -ja $\alpha 6 \beta 4$ -integriinejä (*Muschler ja Streuli 2010*).

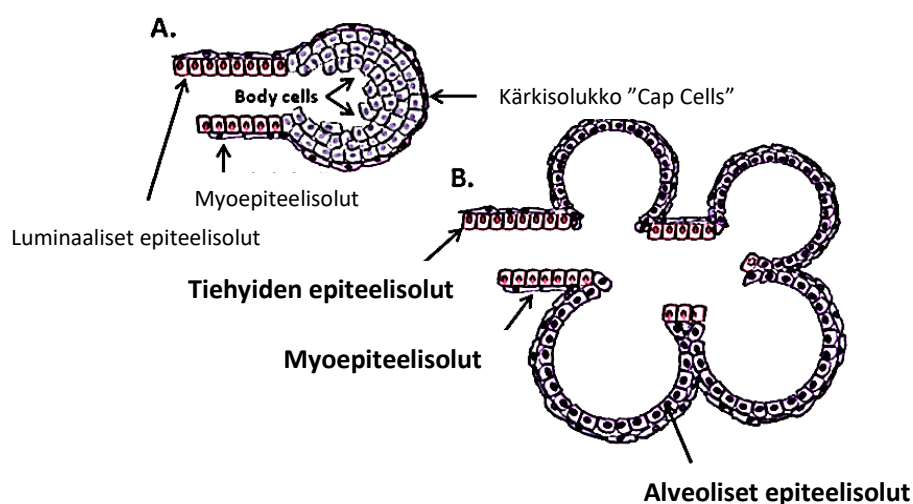
3.2.3 Sekundääriset rakenteet - aikuisen rintarauhanen

Puberteetin aikana kasvavat estrogeenin ja kasvuhormonin pitoisuudet stimuloivat primäärirauhasen tiehyiden pituuskasvua ja siitä riippuvaista sekundääristä haaroittumista, jota johtaa tiehyiden silmukkamainen päädyn rakenteiden kasvusolukko (terminal end bud; TEB). TEB etenee tukikudoksessa kollektiivisen soluvaelluksen vetämänä ja tukikudoksen paikallisten signaalien ohjaamana (*Gjorevski ja Nelson 2011, Macias ja Hinck 2012*).

TEB sisältää kasvupintaa peittävän kärkisolukon (cap cells), sekä silmun luminaalisen solukon (body cells), joista erilaistuvat kasvavan tiehytepiteelin myoepiteelisolut ja tiehyiden luminaaliset epiteelisolut (kuva 1: a). TEB:in heikosti polarisoitunut solukko on organisoitunut kadheriinin avulla, joista e-kadheriinin on havaittu yhdistävän TEB:in luminaalisia soluja, ja p-kadheriinin kärkisolukkoa ja muodostuvia myoepiteelisoluja (*Srinivasan ym. 2003, Hinck ja Silberstein 2005*). TEB:in solukerrosten välisiä liitoksia ja tyvikalvon muodostusta säätelevät luminaalisolujen erittämä Netrin-1, epiteelisolukkojen erittämä Slit-2 sekä tiehyiden tukikudoksen erittämä Reln -proteiinit (*Macias ja Hinck 2012, Srinivasan ym. 2003*). Luminaalisia ja myoepiteelisiä soluja erilaistaviksi tekijöiksi on ehdotettu epidermaalisen kasvutekijä (EGF) -perheen amfireguliinin (AREG) tai EGF:n tuottamia intensiteettieroja ihmisen EGF -reseptorin (EGFR) välittämän solunulkoisen signaloinnin säätelemän kinaasi-1/2:n (Erk 1/2) -vasteessa (*Pasic ym. 2011*).

Valmiin tiehytepiteelin rakenteelliseksi perustaksi on ehdotettu erilaistuneiden solutyypin liitoksia ylläpitäviä desmosomeja, jotka eristävät solupopulaatiot omiksi kerroksikseen. Molempien epiteelisolutyypin on havaittu ilmentävän desmoglein- ja desmocollin-2 -tyyppejä, mutta ainoastaan myoepiteelisolut ilmentävät tämän lisäksi desmoglein-3 -tyyppiä, joka kykenee sitomaan desmoglein-2 -proteiineja (*Muschler ja Streuli 2010*). Kypsän tiehyen epiteelikerrosten välisen tyvikalvon proteiineista molemmat epiteelisolutyypit tuottavat laminiini-511/512 -ja 322 -tyyppejä (LAM-511/2,322), ja ainoastaan basaaliset myoepiteelisolut näiden lisäksi LAM-111:tä (*Gudjonsson*

ym. 2001). Raskauden aikana TEB:ien luminaaliset epiteelisolut erikoistuvat maitoa erittäviksi rauhasiksi, ja maitorauhasen ympärille häkkinäisesti sijoittuvat myoepiteelisolut toimivat maitorauhasta ja tiehyitä supistavana lihaksistona (*Hinck ja Silberstein 2005, Muschler ja Streuli 2010*).



Kuva 1. Rintarauhasen TEB:in rakennetta havainnollistava kaavakuva kasvuhaaran kärkisolutkosta (cap cells) ja luminaalisesta solukosta (body cells), sekä tiehyiden luminaalisista ja myoepiteelisistä solukoista (a). Tertiääristen maitorauhasen rakenteiden muodostuessa TEB kasvattaa erilliset luumenit ympäröivään kudokseen, joiden sisäsolukko erilaistuu erittäviksi luminaalisoluiksi (b). Kuva muokattu julkaisusta *Gajewska ym. 2013*; Autophagy in Development and Remodelling of Mammary Gland, Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? Kuvan tekijänoikeudet LIITE 5.

Rauhasen epiteelisolukon jakautumista ja etenemistä säädelään IGF-I, FGF ja HGF - kasvutekijöiden avulla

Kasvuhormonin käynnistämä tukikudoksen insuliinin kaltaisen kasvutekijän (IGF-I) ilmentäminen edistää TEB:in luminaalisten epiteelisolujen jakautumista, ja on keskeinen sekundääristen rakenteiden kasvua ajava tekijä (*Hinck ja Silberstein 2005*).

Estrogeenin säätelyketjuun kuuluva tukikudoksen fibroblastikasvutekijä (FGF) aktivoi TEB:in luminaalisen epiteelisolukon jakautumista, erilaistumista ja rakenteiden haaroittumista. Säätelyketjussa estrogeeniä sitova estrogeenireseptori-1 käynnistää EGF-perheeseen kuuluvan AREG:in tuotannon TEB:in solukossa. AREG:in parakriinista signalointia vastaanotetaan tukikudoksen solujen EGF -reseptorilla (EGFR), joka käynnistää tukikudoksen soluissa FGF:n tuotannon (*Gjorevski ja Nelson 2011, Macias ja Hinck 2012, Sternlicht 2005*).

FGF -reseptorin ilmentämistä aktivoidaan mm. solujen $\beta 1$ -integriinien välittämällä signaloinnilla, joka on tyvikalvon LAM-511 -kontaktin säätelyä. (*Muschler ja Streuli 2010*). TEB:in FGF2-reseptorilla vastaanotetaan mm. TEB:in vaeltavaa solukkoa kemotaksisesti ohjaavan FGF10:n signalointia, jota esiintyy paikallisesti rinnan tukikudoksessa perlekaaneihin sitoutuneena (*Muschler ja Streuli 2010, Sternlicht 2005*). FGF:n on ehdotettu myös positiivisesti säätelyvän epiteelipintojen primääricilian tuottoa, jotka hiljentävät haaroittumista edistävien Wnt -tyyppien aktiivisuutta (*Gjorevski ja Nelson 2011, Muschler ja Streuli 2010*).

Estrogeeni aktivoi tukikudoksen estrogeenireseptori-1:n välityksellä myös metalloproteaasien (MMP) tuottoa, sekä hepatosyyttikasvutekijää (HGF), jota tuotetaan mm. rintarauhasen välittömässä läheisyydessä olevissa fibroblasteissa (*Gjorevski ja Nelson 2011, Sternlicht ym. 2005*). Hiirikokeissa HGF:n on havaittu käynnistävän haaroittumista ja migraatiota myoepiteelisoluissa ja voimakkaan kasvuvasteen luminaalisissa epiteelisoluissa (*Niranjan ym. 1995*).

Tukikudoksen paikallisia kaavoittavia tekijöitä ovat kollageeni-I, kudoksen jäykkyys ja kasvualustan TGF β -gradientit

Tukikudoksen muuntava kasvutekijä- β (TGF β) -gradientit ovat keskeisessä roolissa sekundäärirakenteiden kaavoituksessa, ja on ehdotettu, että kudoksen pintakuviointi määrittäisi TGF β :n gradienttien muodostumista (*Gjorevski ja Nelson 2011*). Kokeellisesti tuotetun korkean paikallisen tukikudoksen TGF $\beta 1$ -pitoisuuden on havaittu estävän haarautumista ja solujen jakautumista (*Nisticò ym. 2014, Sternlicht 2005*). TGF β säätely myös metalloproteaasien toimintaa, sekä kudossympäristön jäykkyyttä säätelyvän kollageeni-I:n ristisidoksia muodostavan lysyylioksidaasin sijoittumista ja toimintaa (*Sternlicht 2005, Hu ym. 2017, Taylor ym. 2011*). Kudosten

lysyylioksidaasi toimii kollageeni-I:n rakenteen säätelyn lisäksi myöskin TGFβ:n lukuisten vaihtoehtoisten signaalintireittien keskeisenä säätelijänä, vaikuttaen mm. TGFβ:n kykyyn toimia kasvua rajoittavana -tai vaihtoehtoisesti migraatiota edistävänä tekijänä β1-integriini - MAPK –reitin välityksellä (*Butcher ym. 2009, Taylor ym. 2011*). TGFβ:n ilmentämistä edistävät estrogeeni ja progesteroni, ja sitä erittää mahdollisesti tiehyen epiteelisolukko (*Hinck ja Silberstein 2005*). TGFβ:n latentista esimuodosta aktivoivina tekijöinä toimivat mm. metalloproteaasit, joista erityisesti tukikudoksen MMP9 on yhdistetty kasvavaan TGFβ -aktiivisuuteen (*Sternlicht 2005, Gjorevski ja Nelson 2011*).

Esimerkkeinä TGFβ:n säätelemien metalloproteaasien yhteisvaikutuksista ovat liian lähekkäisen sekundäärihaaroittumisen ehkäisy sekä olemassa olevien haarojen pituuskasvun edistäminen. Prosessissa paikallinen TGFβ inhiboi haaroittumisen käynnistävää MMP3:n toimintaa ja samanaikaisesti edistää solujen jakautumista ja selviytymistä edistävän MMP2:n ilmentymistä. (*Gjorevski ja Nelson 2011, Sternlicht 2005*). Lisäksi TGFβ estää solujen adheesiota edistämänsä Wnt5:n välityksellä, ja inhiboi kasvua edistävän HGF:n toimintaa. (*Gjorevski ja Nelson 2011, Hinck ja Silberstein 2005*).

Rintakudoksen rakennetta ylläpitävä kollageeni-I on kriittinen TEB:in soluvaellusta β1-integriinien välityksellä ohjaava maamerkki, ja lisäksi yhdessä elastiinin kanssa keskeinen kudoksen jäykkyyden muodostaja (*Brownfield ym. 2013, Dhimolea ym. 2010*). Fibroblastit vastaavat kollageeni-I:n erityksestä ja sijoittumisesta tukikudoksessa makrofaagien ja eosinofiilien avustamana, ja rintakudoksen histologisissa tutkimuksissa on havaittu, että kollageeni-I:n määrä kasvaa tiehyiden alueilla ja maitorauhasten ympäristö on sen sijaan vapaa kollageeni-I -tyypistä (*Hinck ja Silberstein 2005, Muschler ja Streuli 2010*). TGFβ:n säätelemä sulfonihappo-glycosaminoglykaanien ja kollageeni-I:n sijoittuminen tiehyiden ympärille on ehdotettu tuottavan jäykän kudoksen ympäristön, joka ohjaa TEB:in kasvun suuntaa alhaisemman jäykkyyden kudosalueille. (*Hinck ja Silberstein 2005, Hu ym. 2017*).

3.2.4 Tertiäriset rakenteet – maitorauhanen

Rintarauhaset muotoutuvat toimintakykyisiksi raskauden aikana, jolloin muodostuvat maitoa erittävät tertiäriset rakenteet. Maitorauhasten esiinkasvu käynnistyy raskaudenaikaisen estrogeenin, progesteronin ja prolaktiinin ohjaamina.

Veressä kiertävä estrogeeni käynnistää paikallisen progesteronin erityksen TEB:in rauhasepiteelissä. Parakriinisesti leviävä progesteroni käynnistää alveolin muodostavien silmurakenteiden esiinkasvun, joka syrjäyttää rasvakudosta tiehyiden välitilasta (kuva 1: b). Progesteroni säätelee tuman kappa- β -tekijän (NF- κ B) reseptoreja aktivoivan RANK -proteiinin ligandin (RankL) tuotantoa, jonka välittämä säätely edistää lähialueen solujen jakautumista ja β -kaseiinin ilmentämistä. RankL käynnistää soluissa myös paikallisen NF- κ B:n tuotannon (*Macias ja Hinck 2012*).

Raskaudenaikainen prolaktiini eritetään käpyrauhasesta ja rintarauhasen epiteeleistä, ja sen säätelyä vastaanotetaan rinnan epiteelissä (*Macias ja Hinck 2012*). Prolaktiini säätelee progesteronin, PI3-kinaasin (PI3K) ja januskinaasi/transkriptiotekijä - aktivoija - 5 (JAK/STAT5) -ketjujen signalointia. Prolaktiinin signalointia vastaanotetaan proteiinikompleksilla, joka rakentuu prolaktiinireseptorin, signaali-säätelyproteiini-alfa:n (SIRPA) ja β 1-integriinin kimpusta, jossa SIRPA välittää prolaktiinireseptorin kontaktia soluvastetta säätelevälle β 1-integriinille (*Macias ja Hinck 2012*). Tyvikalvon laminiineilla on tärkeä rooli maitorauhasen kehityksessä mm. ylläpitämällä käynnistynyttä JAK/STAT5 -signalointia β 1-integriinin kautta, vakauttamalla prolaktiinireseptorin aktiivista konformaatiota, sekä toimimalla prolaktiinireseptori-proteiinikompleksin kanssa yhteistyötä tekevän dystroglykaanin pääsääntöisenä sitojana. LAM-111 on havaittu keskeiseksi laminiinityypiksi yhteistyössä prolaktiinireseptorin ja dystroglykaanin kanssa. (*Hu ym. 2017, Akhtar ja Streuli 2013, Muschler ja Streuli 2010*).

JAK/STAT5 -signalointi tuottaa progesteronin tavoin RankL -proteiinia ja β -kaseiinia, sekä myös STAT5 -tekijää ja maidon tuotantoa säätelevää heraproteiinia. Toiminnallisten maitorauhasten polarisoituessa on havaittu, että β 1-integriini -välitteinen STAT5-integriinikinaasi (ILK) -signalointi säätelee solunsisäisten mikroputkien orientaatiota sekä Golgin laitteen sijoittumista polarisoituneen

solun apikaaliselle puolelle, mikä mahdollistaa apikaalisten proteiinien erittämisen luumeniin (*Akhtar ja Streuli 2013, Muschler ja Streuli 2010*).

Rintarauhasen solujen *in vitro* -kokeissa tuotettujen polarisoituneiden rauhasen on havaittu tyhjenevän apoptoottisesti mm. Bcl-2 -perheeseen kuuluvan erityispitkän Bim (Bim (EL)) -proteiinin avulla, jonka transkription negatiiviseksi säätelijäksi on RNA -interferenssikokeissa havaittu tyvikalvon $\beta 1$ -integroinikontakti. Tuotetun Bim(EL) -proteiinin aktiivisuus on puolestaan solunulkoinen signaali-kinaasi / mitogeneeniaktivoituva-kinaasi (Erk/MAPK) -ketjun säätelyä, jossa integroinivälitteinen EGF2 -reseptori säätelyä positiivisesti Bim(EL):iä inaktivoivan Erk -kinaasin toimintaa. Soluissa aktiivinen Bim(EL) inaktivoi Bcl-xl -proteiinia, jonka tehtävänä on inaktivoita kaspasien ja solustressin aktivoimia, apoptoosia ajavia tekijöitä. Bim(EL):in toiminta johtaa lopulta apoptoosin käynnistävien happiradikaalien sekä sytokromi-c -tekijöiden vapautumiseen mitokondriasta (*Reginato ym. 2003*). Bim(EL):in toiminnan käynnistyminen vaatii todennäköisesti sekä tyvikalvon $\beta 1$ -integroinikontaktin katoamista, että myöskin EGFR:n välittämän signaalin poistumista (*Reginato ym. 2003*). Joutuessaan kasvavan solumassan keskiosiin solu erkaantuu $\beta 1$ -integroinin sitomista tyvikalvon kontakteistaan, jolloin Bim(EL):in transkription on havaittu nousevan, ja lisäksi EGFR:n ilmentymisen on havaittu tarpeettomana laskevan (*Reginato ym. 2003*). EGFR:n välittämän Erk:in toiminnan samalla loppuessa alkaa aktiivisen Bim(EL):n pitoisuus nousta solussa, mikä lopulta käynnistää apoptoosin (*Reginato ym. 2003, Nedvetsky ym.2012*).

Hallitussa rakenteiden muokkauksessa apoptoosilta valikoivasti suojaavaksi tekijäksi on havaittu c-FLIP -perheen kaspasi-8:n inaktiivinen homologi FLIP-L -variantti, joka kilpailee kaspasi-8:n sitoutumiskohdista solukalvojen apoptoottisissa proteiinikomplekseissa (*Yerbes ym. 2011*). Solukalvojen apoptoottiset reseptorikompleksit sijaitsevat prosessin säätelyketjun ylävirrassa ja mahdollistavat pro-apoptoottisten tekijöiden synnyn soluun, joiden aktivaation Bim myöhemmin välillisesti mahdollistaa (*Reginato ym. 2003, Yerbes ym. 2011*). C-FLIP -proteiinien transkriptio on NF- κ B -tekijän positiivisesti säätelyä, jonka tuotantoa puolestaan säädellään aiemmin kuvaillun JAK/STAT -ketjun tuottaman RankL -proteiinin avulla (*Macias ja Hinck 2012, Yerbes ym. 2011*).

Polarisoituneiden alveolien muodostuttua luminaaliset epiteelisolut aloittavat maidon tuotannon. Jälkeläisten imemisen aiheuttama nännipihan kudoksen ärsytys tuottaa aivoissa oksitosiinia, joka käynnistää myoepiteelisolujen myosiinisäikeiden supistumisen maitorauhasen ympärillä Rho -

kinaasin signalointiketjulla (*Glukhova ja Streuli 2013*). Imettämisen loputtua rinnan erittävät epiteelit poistuvat apoptoottisella prosessilla, jota kutsutaan involuutioksi. Erittävien rakenteiden muokkaus poistaa suurimman osan erittävästä epiteelistä korvaten rakenteet rasvasolukolla (*Macias ja Hinck 2012*)

3.3 Rintakudoksen mallinnus *in vitro*

3.3.1 Rintakudoksen 3U-*in vitro* -alustan proteiineja ja fysikaalisia ominaisuuksia

In vitro -tutkimuksissa on havaittu, että tukikudokselle tyypillisen kollageeni-I:n ja rauhasepiteeliä polarisoivan LAM-111:n keskinäiset suhteet, yhdessä ympäristön jäykkyyden kanssa, määrittävät 3U -viljelmän tulevan morfologian (*Benton ym. 2009, Chaudhuri ym. 2014, Lance ym. 2013, Alcaraz ym. 2008, Benton ja George 2005, Qu ym. 2015*). Kollageenipitoisuuden ollessa vallitseva solut noudattavat rauhasen sivuhaaroja muodostavaa kehitysohjelmaa, jonka riittävä tyvikalvoproteiinien pitoisuus muuttaa maitorauhasen polarisoituviksi alveolirakenteiksi, luonnollisen kudoksen rakenteita mukaillen (*Benton ym. 2009, Nguyen-Ngoc ym. 2012, Hu ym. 2017*). On ehdotettu, että 3U -ympäristön ominaisuudet vaikuttavat polarisoitumisen ja ontelon muodostuksen nopeuteen ja mekanismeihin, joissa hitaasti polarisoituvien sferoidien ontelo muodostuisi apoptoosista riippumattomalla mekanismilla (*Mailleux ym. 2007, Pearson ym. 2010*).

Laminiini -111 (LAM-111)

LAM-111 vakauttaa solusidoksia säätelemällä positiivisesti DNA-metyylitransferaasi-1:n aktiivisuutta e-kadheriinipromootorilla, ja säätelee lisäksi $\beta 1$ -integriinin välityksellä solusäikeiden ja Golgin laitteen uudelleensijoittumista epiteelisolukon polarisoitumisprosessissa (*Benton 2009, Spencer ym. 2011, Akhtar ja Streuli 2013*). Lisäksi LAM-111:n on todettu estävän RNA -polymeraasien sitoutumista DNA:han, estävän aktiini-myosiiniketjujen toimintaa, sekä kykenevän ylläpitämään epiteelisolujen alhaisen aktiivisuuden tilaa hiljentämällä tuman β -aktiinin toimintaa (*Alcaraz ym. 2008, Spencer ym. 2011, Le Beyec 2007*). Rintakudoksen luminaali- ja myoepiteelisolujen välisen tyvikalvon LAM-111 on myoepiteelisolujen tuottamaa ja toimii luminaalisia epiteelisoluja polarisoivana tekijänä

(*Gudjonsson ym. 2001*). LAM-111 -pitoisuuden on havaittu olevan suoraan verrannollinen sen kykyyn polarisoida kontaktisolukkoa, ja alhaisin toiminnallinen pitoisuus 2U -viljelmien pinnoitteena puhdasta LAM-111:ä on ollut 1,6 - 2 mg/ml (*Benton ja George 2005*). Osana 3U-Matrigel™ -seosta LAM-111 määrän tarve on havaittu huomattavasti vähäisemmäksi, mikä korostaa 3U -kasvatusalustan mekaanisten ominaisuuksien sekä proteiinien yhteistyötä morfologian muodostuksessa (*Benton ym. 2009, Lance ym. 2013*).

Rintakudoksen mallinnuksessa käytetty yleisin *in vitro* -sovellus on Engelbreth-Holm-Swarm -hiiren sarkoomakasvaimesta eristetty, tyvikalvoa mallintava Matrigel™ -geeli, joka sisältää LAM-111:tä noin 60%, kollageeni-IV:ä 30% ja entaktiinia 8%, sekä vähäisiä määriä kasvutekijöitä ja perlekaania (*BD Biosciences*). Matrigel™:n yleisimmät 3U -viljelyprotokollat joko pitävät solut kokonaan sisällään 3U-Matrigel™-elatusneste -seoksessa, tai vaihtoehtoisesti Matrigel™ -geelikerroksen pinnalla ns. 2,5U -viljelminä, joiden vaihtuva elatusneste sisältää Matrigel™:ä 2-5% v/v (*Qu ym. 2015, Lance ym. 2013, Reginato ym. 2005*).

Kollageenit I ja IV

Sekundääristen rakenteiden kehityksessä tärkeimmäksi tyvikalvon kontakteja välittäväksi kalvoproteiiniksi on havaittu pääosin kollageeni-I:tä ja vähäisemmässä määrin LAM-111:tä sitova integriinidimeeri- $\alpha 2\beta 1$, jonka keskeiseksi rakenneosaksi on arvioitu $\beta 1$ -integriini. Dimeerin toiminnallisuuden poiston on havaittu estävän lähes kokonaan rintarauhasen kasvun ja haaroittumisen hiirikokeissa. (*Sternlicht 2005*).

Rinnan tukikudoksen kollageeni-I sijoittuu rintarauhasta ympäröivän tukikudoksen tiehyiden ympäristöön, ja kollageeni-IV -tyyppi rauhasepiteelin välittömän kontaktin tyvikalvolle (*Brownfield ym. 2013, Muschler ja Streuli 2010*). Kollageeni-I:n on havaittu tarjoavan rakenteellista tukea kudosten jäykkyys - elastisuuden muodostuksessa, sekä migraatiota edistävän biologisen kontaktin soluille $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin välittämänä (*Brownfield 2013, Dhimolea ym., Muscher ja Streuli 2010*). Kollageeni-IV:llä on merkittävä rakenteellinen osuus maitorauhasen tyvikalvon eheyden ylläpidossa ja diffuusion säätelyssä eri kehitysvaiheissa (*Gaiko-Shcherbak ym. 2015*).

In vitro malleissa kollageeni-I -tyyppiä hyödynnetään rintakudoksen haaroittumisen ja rauhaspuun rakenteiden mallinnuksessa, sekä yleisesti syöpäsolulinjojen metastaasin kehityksen mallinnuksessa

(*Dhimolea ym. 2010, Qu ym. 2015, Nguyen-Ngoc ym. 2012*). Kollageeni-IV -tyyppiä esiintyy yleisesti organoidien 3U -mallinnuksessa käytetyn Matrigel™:n luonnollisena rakenneosana, jossa se yhdessä nidogeenin kanssa tehostaa LAM-111:n signalointia (*Gaiko-Shcherbak ym. 2015*).

3.3.2 MCF 10A rintarauhasen solumallina

NFC:n 3U -mallinnuksessa käytetty solulinja MCF 10A on American Type Culture Collection:in (ATCC) kuvauksen mukaisesti ihmisen fibrokystisestä, ei-neoplastisen rintarauhasen adherentista solupopulaatiosta eristetty epiteelinen solulinja. Linjan eristänyt työryhmä kuvaili lahjoittajakudoksen lisäksi omaavan laajentuneita tiehyitä, hyvänlaatuista apokriinista solutyypin muuntumista, sekä paikallisesti tiehyiden sisäistä, hyvänlaatuista liikakasvua (*Soule ym. 1990*). Valomikroskoopilla arvioiden linjan 2U -morfologian on kuvattu muistuttavan tiehytepiteelin luminaalista solutyyppejä. MCF 10A ilmentää maidon rasvaglobuliiniantigeenia, solun sisäkeratiineja sekä epiteelisiä sialomukiineja, ja linja välttää ajoitetun solukuoleman genominsa Myc -geenin monistumilla ja solukuolemaa säätelevien geenien p14ARF ja p16 häviämällä (*Qu ym. 2015, ATCC*). Tietoa solulinjan luovuttaneen potilaan mahdollisista raskauksista ei ole saatavilla. MCF 10A -linja on kykenevä toistamaan rintarauhasen rauhaspuun ja maitorauhasen kehitysvaiheita oikeanlaisessa kasvuympäristössä, ja on laajalti käytetty normaali rintarauhasen solumalli rinnan kehityksen ja rintasyövän tutkimuksissa.

Linjan käyttäytymisessä on havaittavissa laboratoriokohtaisia eroja mm. polarisoitumisen ja ontelon muodostuksen nopeudessa. Osa eroavaisuuksista johtuu julkaisuissa käytettyjen viljelyalustojen proteiinipitoisuuksien eroavaisuuksista, jotka tavallisesti ilmoitetaan proteiinimäärien sijaan elatusnesteeseen sekoitussuhteina v/v. Kasvun tahdin sekä ontelon muodostuksen nopeutta säätelee myös MCF 10A:n elatusnesteessä tavallisesti käytetty koleratoksiini, joka toimii solujen syklisen adenosiinimonofostaatin (cAMP) analogina, säätelee cAMP:in tuottoa adenylyylisyklaasin välityksellä, ja vaikuttaa solun proteiinikinaasi-A:n signalointiketjuun. CAMP:in on havaittu tehostavan polarisoitumista säätelemällä $\alpha 6$ -integriinin uudelleensijoittumista, sekä tehostavan luminaalisten solujen apoptoosia lisäämällä Bim -proteiinin tuottoa ja estämällä Bim:ä inaktivoivan

Erk:in toimintaa. Koleratoksiinin puuttumisen on havaittu aiheuttavan viivästynyttä luumenin muodostusta (*Nedvetsky ym.2012*).

Yleisen käytettävyytensä vuoksi linjaa on myös arvioitu vasta-aine -ja erilaistumiskokeissa, joiden mukaan MCF 10A -linja on heterogeeninen tai omaa kantasolujen piirteitä (*Qu ym. 2015*). 2U -viljelmissä linjan on havaittu ilmentävän basaalista vimentiniä, alfa-SMA:ta, n-kadheriinia sekä luminaalista e-kadheriinia. Basaali-epiteelisistä keratiinityypeistä noin 50% solukosta ilmensi keratiini-5:ta (K5) ja alle 1% K14:ta, ja luminaalisista keratiineista noin 50% soluista ilmensi keratiini-8:a (K8) ja alle 10% keratiini-18:ta (K18). 2U -viljelmien vasta-aine analyysissä MCF 10A ilmensi kantasolujen proteiineja EpCAM, MUC^{matala}, ALDH1A3, integriini-a6 (CD49f), CD44, Oct4, ja Sox2. 2U -viljelmissä linjan ei havaittu ilmentävän estrogeeni- tai progesteronireseptoria, eikä β -kaseiinia tai alfa-maitoalbumiinia (*Qu ym. 2015*). BCL11B -transkriptiotekijän on havaittu ylläpitävän MCF 10A:n kantasoluiksi ehdotettua solupopulaatiota 3U -ympäristössä (*Miller ym. 2018*).

Siirryttäessä 3U -rakenteita tuottavaan viljely-ympäristöön, MCF 10A -linjan on havaittu menettävän kantasoluproteiinien ALDH1A3:n, integriini-a6:n ja CD44:n ilmentymisen. Mammosferoidien suspensioviljelmissä MCF 10A ilmensi EpCAM, MUC ja CD24 -proteiineja, basaalisia keratiineja K5 ja K17, luminaalisia K8/18 ja K7 -keratiineja, sekä maitoproteiineja β -kaseiini ja alfa-maitoalbumiinia, joista K18:n ja K7:n sekä maitoproteiinien ilmentymiset nousivat jyrkästi verraten 2U -viljelmiin. 5% MatrigelTM-elatusneste v/v 2,5U -viljelmissä MCF 10A ilmensi onton sferoidin solukossa luminaalisten epiteelisolujen keratiineja 8 ja 18 sekä basaalisten epiteelisolujen K14:ta ja alfa-SMA:ta. Lisäksi 3U -viljelmissä ilmentyi myös b-kaseiinia ja alfa-maitoalbumiinia. Kollageeni-I – MatrigelTM 3U -alustalla MCF 10A muodosti onttoja sferoideja sekä onttoja tiehyen rakenteita, joissa ilmentyivät päällekkäin proteiinit SMA, K14, K18, K8, sekä b-kaseiini ja alfa-maitoalbumiini (*Qu ym. 2015*).

3.3.3 MCF 10A 3U -ympäristössä

Alan tutkimusten 3U-*in vitro* -alustojen venytysstressin mittaukset viittaavat MCF 10A:n menestyvän parhaiten LAM-111:ä sisältävässä, noin 30 Pascalin (Pa) 3U -ympäristössä, jossa luumenin sisältävien sferoidien muodostus on havaittu tehokkaimmaksi (*Chaudhuri ym. 2014, Lance A. ym. 2016*).

Mekaanisen signaloinnin merkitystä 3U -morfologian muodostuksessa on lisäksi havainnollistettu tutkimuksissa, joissa tavallisesti alveolin muodostuksessa tehottoman kollageeni-I -alustan havaittiin MCF 10A:n 3U -viljelmissä mahdollistavan sferoidien ja tiehyiden ontelon muodostuksen kahden viikon viljelyssä, mikäli alusta kelluu irrallaan viljelykaivon seinämistä. Rauhasepiteelin haaroittumisen ja tiehyiden muodostuksen havaittiin tapahtuvan erityisesti kelluvan geelin yläkerrostumissa, ja sferoidien muodostuvan kaikkialla geelissä, painottuen geelin keskiosiin (*Dhimolea ym. 2010*).

Tutkimuksen analyysien mukaan viljelmien ontoissa sferoideissa havaittiin viitteitä epätäydellisestä polarisoitumisesta mm. luminaalisen sialomukiinin sijoittumisessa myös basaaliselle pinnalle, sekä kollageeni-IV:n puuttumisessa, joiden syiksi epäiltiin LAM-111:n tai LAM-111:tä tuottavien myoepiteelisolujen puuttumista (*Dhimolea ym. 2010*). Mikäli MCF 10A edustaa erilaistumiskykyistä kantasolutyyppiä ja mahdollisesti vaatii pidennetyn viljelyajan *in vitro* -olosuhteissa eri solutyypin toiminnallisen erilaistumisen mahdollistamiseksi, on vielä toistaiseksi selvittämättä (*Shehata ym. 2012, Qu ym. 2015*).

Maitorauhasten morfogeneesiä tutkivissa kokeissa on lisäksi havaittu, että irrallaan kelluva kollageeni-I -kasvualusta, mutta ei 2U -muovialusta, mahdollistaa maidon tuotantoon liittyvien β -kaseiinin ja transferriinin ilmentämisen laktogeenisten kasvutekijöiden läsnä ollessa (*Streuli ja Bissell 1990*). Lisäksi maidon tuotantoa on havaittu myös perinteisessä, alustaan kiinnittyneessä Matrigel™ 3U -alustassa, mutta ei kiinnittyneessä kollageeni-I -alustassa, joten on mahdollista, että kellumisen tuottamat mekaaniset säätelymuutokset mahdollistavat soluissa alustan puuttuvia tekijöitä korvaavien tyvikalvoproteiinien tuotannon (*Qu ym. 2015, Streuli ja Bissell 1990*).

4. Tutkimuksen tavoitteet ja koeasetelma

Tutkimuksen tavoitteena oli arvioida muokkaamattoman natiivi-NFC:n soveltuvuutta polarisoitumaan kykenevän epiteelisen solulinjan rakennekehityksen tukemisessa, sekä tarkkailla materiaaliin sekoitetun, rintarauhasen tyvikudokselle tyypillisen LAM-111:n vaikutusta solujen käyttäytymiseen viljelyn aikana. LAM-111 -lisän pyrkimyksenä oli tuottaa polarisoituneita ja onttoja sferoideja, joita MCF 10A:n on havaittu muodostavan Matrigel™ 3U -viljelmissä.

Soluväliaine -ympäristön vaikutusta polarisaatiotapahtumaan arvioitiin kolmella rinnakkaisella olosuhteella, joita olivat natiivi-NFC, NFC:n ja LAM-111:n seos (NFC-LAM-111), sekä Matrigel™. Yleisesti alalla käytetty Matrigel™ 2,5U -viljely-ympäristö toimi positiivisena kontrolliolosuhteena, jossa solut siirrostettiin Matrigel™ alustan päälle ja viljeltiin 2% Matrigel™ - elatusneste -seoksessa. LAM-111:n määrät pidettiin samoina Matrigel™-kontrollin elatusnesteeseen ja NFC-LAM-111 -olosuhteen välillä. Valitussa LAM-111 -pitoisuudessa pyrittiin huomioimaan mahdollisen tuotesovelluksen hinta - hyötysuhdetta tutkimusryhmien sekä materiaalin valmistuksen kannalta. Tässä tutkimuksessa käytetty laminiinin määrä edustaa edullisinta vaihtoehtoa, jolle on löydettävissä aikaisempia 2,5U -verrokkitutkimuksia Matrigel™:llä (*Reginato ym. 2005*).

Viljelmien kehityksen seurannassa tarkastelun kohteena olivat muodostuvien solusferoidien solusäätely, morfologia, koko, sekä havainnot apoptoottisista soluista. Olosuhteista kerättyjä aikapistenäytteitä verrattiin keskenään mikroskooppikuvannuksella, immunovärjäyksillä, histologisilla analyyseillä ja reaaliaikaisella PCR-analyysillä (quantitative PCR; qPCR), joissa tarkasteltiin polarisaatiotapahtuman ja apoptoottisen prosessin aikana erittyviä proteiineja ja lähetti-RNA:n (messenger RNA; mRNA) tuottotasojen muutoksia.

Viljelmien morfologian kehitystä arvioitiin valomikroskoopin lisäksi sferoidien hematoksyliini-eosiini (HE) -halkaisurakennevärjäyksillä, sekä e-kadheriinin, vimentiniin ja B4-integriinin ilmentymisen sijoittumista havainnollistavilla immunovärjäyksillä. Viljelmien solusäätelyä arvioitiin PCR -analyyseillä, joissa keskityttiin apoptoottisessa prosessissa keskeisen Bim:in mRNA:n ilmentymiseen, apoptoosilta kudoksen rakenteita valikoivasti suojaavan c-FLIP-L:n mRNA:n ilmentymiseen, sekä solujen polarisoitumisprosessissa keskeisen β 1-integriinin mRNA:n ilmentymiseen.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että MCF 10A linja muuttuu herkästi viljelyssä, jolloin muuntuneen solulinjan muodostamat sfteroidit ovat morfologialtaan poikkeavia (*Debnath ym. 2003*). Varmistaaksemme käytetyn linjan kelpoisuuden 3U-viljely-ympäristöjen vertailuun, 2U -ylläpitoviljelmien solukon morfologia, sekä Matrigel™-2,5U -viljelmien sfteroidien morfologia tarkistettiin mikroskopoinnilla ja immunovärjäyksillä (kuvat 2,3).

5. Materiaalit ja menetelmät

5.1. Materiaalit

MCF 10A CRL-10317™ (ATCC®, USA), MEGM CC-3150 (LONZA, Sveitsi), DMEM 31330 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), hevosen seerumi H1138 (SIGMA, USA), hEGF PHG0311, PHG0314 (Thermo Fisher Scientific, USA), hydrokortisoni H0888 (SIGMA, USA), insuliini 19278 (SIGMA, USA), kolera-toksiini c-8052 (SIGMA, USA), 0,05% Trypsiini-EDTA 59417C (SIGMA, USA), 8-kammiolevy #177445 (NUNC, Thermo Fisher Scientific, USA), Matrigel™ GFR #356230 (Corning, USA), GrowDex® 11911 (UPM Kymmene, Suomi), Cultrex Mouse Laminin 1 # 3400-010-01 (R&D Systems, USA), kudosisviljelykäsittely, tasapohjainen 96-kuoppalevy (Nunc, Tanska; Corning, USA), RPT pipettikärjet (StarLab, Espanja), selluloosaentsyymi (VTT, Suomi), Low Bind eppendorf tube (Eppendorf, Saksa), 4% PFA (Viikin Biokeskus, Elatuskeittiö), Super PAP nesteenrajauskynä (Daido Sangyo, Japani), Shandon kudismuste (Thermo Fisher Scientific, USA), HistoGel (Thermo Fisher Scientific, USA), GM130 (NBP1-89756, Bio-technique / R&D Systems, USA), B4-integriini sc-9090 (Santa Cruz USA), vimentini sc-6260 (Santa Cruz USA), e-kadheriini 14472S/0004 (Cell Signaling Technology CST USA), hiiren IgG sc-2025 (Santa Cruz USA), jäniksen IgG sc-2027 (Santa Cruz USA), glysiini G7126 (SIGMA, USA), vuohen seerumi 16210 (Thermo Fisher Scientific, USA), aasin seerumi (D9663 SIGMA, USA), Alexa Fluor 488, 594 (Thermo Fisher, USA), DAPI (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, USA), ProLong® Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific, USA), Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Saksa), β-merkaptotetanoli (SIGMA, USA), 25G neula (BD Microlance, USA), 1ml ruisku (Terumo, Japani), High capacity RNA to cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, USA), nukleaasivapaa vesi (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA), Applied Biosystems Fast SYBR Green MasterMix (Thermo Fisher Scientific, USA), PCR kuoppalevy 4346906 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, USA).

5.2. Solulinja MCF 10A

Tutkimuksessa käytettiin ihmisen fibrokystisestä rintaepiteelikudoksesta eristettyä normaalia solulinjaa MCF 10A:ta (ATCC® CRL-10317™). Solulinja perustettiin valmistajan suosituksen mukaisesti rintarauhasepiteelin soluille tarkoitetun kasvatuspakkauksen elatusnesteseokseen (MEGM 3150, LONZA, Sveitsi), ja siirrettiin myöhemmästä jaosta Dulbecco:n muunneltu Eagle -elatusneste (DMEM-31330, Gibco Thermo Fisher, USA) -pohjaiseen seokseen, joka sisälsi 5% hevosen seerumia (H1138-100ML SIGMA, USA), 22,5 ng/ml hEGF:ä (PHG0311, PHG0314, Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5 mg/ml hydrokortisonia (H0888-1G SIGMA, USA), 10 ug/ml insuliinia (19278-5ML SIGMA, USA), sekä 100 ng/ml koleratoksiinia (c-8052 SIGMA, USA). MCF 10A:n 3U ja 2,5U -viljelmissä käytettiin DMEM-31330:n valmistettua elatusnestettä, joka sisälsi 2% hevosen seerumia, 5 ng/ml hEGF, 0,5 mg/ml hydrokortisonia, 10 ug/ml insuliinia, sekä 100 ng/ml koleratoksiinia. HEGF lisättiin elatusnesteeseen aina ennen käyttöä. Käytettyjen elatusnesteiden koostumukset ovat esillä J. Brugge työryhmän (Joan Brugge työryhmä; Ludwig Syöpäkeskus, Harvardin Yliopisto) ilmaisjaettujen työprotokollien www -sivulla: *Media recipes for MCF 10A cells, sekä seeding MCF 10A for 3D*. Solulinjan ylläpitojaoissa käytettiin 0,05% Trypsiini-EDTA -reagenssia (59417C SIGMA, USA) n. 12 min. seisotusajalla solukaapissa. Soluviljelykaapin olosuhteet olivat +37 C ja 5% CO₂. Solulinjalle suoritettiin MycoAlert -mykoplasmakoe (Lonza, Sveitsi) ennen koesarjaa, jonka mukaan perustettu linja oli vapaa mykoplasmakontaminaatiosta.

5.3. 3U -viljelmät

Solut siirrostettiin J. Brugge -työohjeen suosituksen mukaisesti täyteen kasvaneista viljelmistä, ja siirrostetut solumäärät olivat n.60 t/kaivo Matrigel™ -viljelmissä, ja 50 t/kaivo NFC -viljelmissä. Siirrostukset tehtiin jaolla 12.

Matrigel™ 2,5U -morfologiakontrollit valmistettiin J. Brugge – ryhmän työohjeen mukaisesti ”*Seeding of MCF 10A for 3D morphogenesis*”. Solut siirrostettiin Matrigel-elatusnesteseoksessa 8-kammiolevylle (#177445 NUNC, Thermo Fisher Scientific, USA) 45ul:n Matrigel™ -alustan päälle

(Matrigel™ GFR #356230, Corning, USA), joka oli kiinteytetty inkubaattorissa 45 minuutin seisotuksella ennen siirrostusta. Matrigel™ -viljelmien elatusnesteeseen lisättiin Matrigel™:n valmistuseristä (9,3-9,5mg/ml) riippuen noin 2% Matrigel™:ä (v/v), jotta saataisiin 115 ug/ml LAM-111 -pitoisuus. Matrigel™ 2,5U -viljelmien elatusneste tilavuutena pidettiin 400 ul protokollasuosituksen mukaisesti (J.Brugge työryhmä). Matrigel™ -viljelmien elatusneste vaihdettiin joka 3.-4. päivä, ja viljelmien lopussa tarvittaessa joka toinen päivä.

NFC-3U -viljelmissä käytettiin GrowDex® erää 11911 (UPM Kymmene, Suomi), ja geeli laimennettiin elatusnesteellä n.30 Pa:n jäykkyyteen (LIITE 1). Geelistä valmistettiin kaksi rinnakkaista olosuhdetta, joista NFC:n kontrolliolosuhte oli elatusnesteellä laimennettua natiivi-NFC:tä, ja kokeellinen olosuhte elatusnesteeseen, NFC:n ja LAM-111:n seosta (Cultrex Mouse Laminin 1 # 3400-010-01, R&D Systems, USA). LAM-111:n määrä pidettiin samana kokeen Matrigel™ 2,5U -kontrollin elatusliuoksen sisältämän laminiinimäärän kanssa, jolloin pitoisuudeksi tuli kontrollina käytetyn Matrigel™ -erän mukaisesti 115 ug/ml. NFC-3U -viljelmät rakennettiin sekoittamalla solut 100 ul:n NFC-seosta, joka pipetoitiin kudosisviljelykäsittelyille, tasapohjaisille 96-kuoppalevyille. Viljelmien päälle pipetoitiin 100 ul elatusnestettä n. 30 minuutin +37 C seisotuksen jälkeen. NFC -viljelmien elatusneste vaihdettiin joka 3.-4. päivä, ja ennen nesteen poistoa kuoppalevyt sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf, 5 min, +37 C. NFC:n, sekä myöhemmin NFC:ssä kasvatettujen solusferoidien käsittelyssä käytettiin adheesiohylliviä RPT -kärkiä (StarLab, Espanja).

Eroavaisuudet elatusnesteiden vaihtojen välipäivissä johtuivat NFC -ja Matrigel™ -viljelykaivojen eri koosta ja eriävistä vaihtonesteen tilavuuksista, sekä Matrigel™:n havaitusta taipumuksesta hajota pitkässä viljelyssä. Kontaminaation läsnäoloa tarkkailtiin säännöllisesti viljelemällä kaivoista kerättyä, käytettyä elatusnestettä n.3-4 päivän ajan inkubaattorissa, eikä viljelyn aikana havaittu kontaminanttien läsnäoloa missään analysoidussa näytteessä.

5.3.1. NFC 3U -alustojen jäykkyyden arviointi

NFC -olosuhteiden jäykkyyden arvioinnit tehtiin sekoittamalla 3U -viljelyssä käytetystä elatusnesteestä ja NFC-geelistä-, sekä elatusnesteestä-, NFC geelistä- ja LAM-111 -lisästä laimennossarjat, joissa ainoastaan NFC:n määrä seoksessa kasvoi sarjassa edetessä. LAM-111 -proteiinilisä pidettiin

jäissä ja lisättiin NFC-geelin päällä lepäävään kylmään elatusnestefaasiin, minkä jälkeen elatusneste – LAM-111 -seos sekoitettiin NFC -geeliin pipetoimalla n.14x, kunnes seos oli homogeeninen. NFC-LAM-111 -olosuhteen työvaiheiden materiaalit pidettiin kylminä, ja kokeen kaikki valmiit seokset seisotettiin +37 C:ssa ennen jäykkyysmittausta. Laimennossarjoista mitattiin geelin elastisuutta varastomodulus-arvoina 0,3%, 0,6% ja 0,9% NFC -pitoisuuksista, jolloin saatiin geelin jäykkyyden kehitys NFC:n pitoisuuden funktiona. Olosuhteiden laimennossarjojen kuvaajien kulmakertoimien yhtälöistä arvioitiin tähän työhön 30 Pa vastaavat NFC -pitoisuudet, jotka olivat natiivi-NFC:lle 0,35% ja NFC-LN111:lle 0,39% (LIITE 1).

5.3.2. NFC:n entsymaattinen hajotus

NFC hajotettiin näytekaivoista lisäämällä elatusnesteen vaihdon yhteydessä selluloosaentsyymiä (VTT, Suomi) aikapistettä edeltävänä päivänä ja seisottamalla viljelmiä +37 C soluviljelykaapissa n. 24 t. Entsyymien toiminnallisena pitoisuutena pidettiin 0,35 mg/ml huomioiden kaivon koko tilavuus NFC -alustoineen. NFC:n hajottua läpinäkyväksi nesteeksi, näytteet kerättiin 1ml kalsium ja magnesium -vapaata fosfaattipuskuroitua saliniä (PBS-) sisältäviin 1,5 ml:n hylkiväpintaisiin Low-Bind eppendorf putkiin (Eppendorf, Saksa) rakenteiden säilömistä varten, tai Crystal Clear -putkiin (Star-Lab, Espanja) PCR -näytteitä varten. Näytteet painettiin putken pohjalle pöytäspinnerillä (Labnet Ministar 6000 rpm, USA) n. 30 s ajan, minkä jälkeen supernatantti poistettiin ja näytteisiin lisättiin 1ml PBS-ta.

5.4. Näytteiden säilöminen paraformaldehydillä

Ennen biologisten rakenteiden säilömistä näytteet oli pesty kahdesti PBS-:lla. Näytteet seisotettiin 4% paraformaldehydissä (PFA) (Viikin Biokeskus, Elatuskeittiö) n. 25 min ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteet pestiin kahdesti PBS- :lla ja säilöttiin jääkaapissa analyysiin saakka ensin PBS:ssä noin viikon ajan, ja myöhemmin 70% etanolissa.

5.5. Hematoksyliini – eosini värjäykset

PFA -säilötyt näytteet pintavärjättiin Shandon -kudosmusteella (Thermo Fisher Scientific, USA) ja upotettiin HistoGeeliin (Thermo Fisher Scientific, USA) käsittelyn helpottamiseksi. Etanoli poistettiin näyteputkesta, ja näytteet pestiin 1 ml PBS:-llä, minkä jälkeen näytteet pipetoitiin RPT -kärjillä 40 µm -huokoskokoisen solusihdin päälle. Ylimääräinen neste imeytettiin paperiin sihdin läpi. Pintamustetta lisättiin n.30 µl näytettä kohden ja seisotettiin 5 min huoneenlämmössä. Muste pestiin pois PBS:-lla ja näytteet siirrettiin RPT -kärjellä n. 20 µl:n tilavuudessa eppendorf-putken korkkiin käärittynä parafilmimuottiin, joka oli päällystetty kovettuneella histogeelillä. Ylimääräinen neste poistettiin, ja näytteen päälle laskettiin nestemäistä ja lähes jähmettyvää histogeliä. Geelin kovetuttua näyte siirrettiin PBS:-än ja säilytettiin +4 C:ssa ennen parafinointia. 3U -viljelynäytteiden parafinointi sekä näytteiden halkaisuleikkeiden HE-värjäykset teetettiin Viikin koe-eläinpatologian keskuksessa (FCLAP, Suomi).

5.6. Immunovärjäykset

Vasta-aine -värjäykset tehtiin Super-PAP -nesteenrajauskynällä (Daido Sangyo, Japani) rajatuissa sarakkeissa näytelasin päällä. PFA – säilötyistä NFC:ssä kasvatetuista sferoideista huuhdeltiin pois etanoli siirtämällä näyte pienessä tilavuudessa hylkiväpintaiseen putkeen, joka sisälsi n.500 µl PBS:-ta. Etanolihuuhtelun jälkeen NFC:ssä kasvatetut sferoidit sekoitettiin 120 µl:n PBS:-ta, ja pipetoitiin näytelasin päälle 20 µl:n tilavuudessa omiin sarakkeisiinsa. Matrigel™ kaivot rajattiin skalpellilla neljään osaan, minkä jälkeen palat raavittiin varovasti irti käyttäen kapeaa metallilastaa. Palat siirrettiin kaivoista PBS:-ta sisältäviin putkiin kapeiden pinsettien avulla etanolin huuhtelua varten, joista Matrigel™ -palat siirrettiin edelleen näytelasin päälle 20 µl:n PBS- pisaroihin. Näytteitä seisotettiin n.20 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen suurin osa näytteestä pysyi lasiin kiinnittyneenä varovasta pipetointikäytäntöä noudattaen. Näytteiden rakenteita arvioitiin vasta-aineilla, jotka sitoutuivat GM130:n (NBP1-89756, Bio-technie / R&D Systems, USA), B4-integriiniin (sc-9090, Santa Cruz USA), vimentiniin (sc-6260, Santa Cruz USA), e-kadheriiniin (14471S; 14472S/ 0004, Cell Signaling Technology CST USA), hiiren IgG:hen (sc-2025, Santa Cruz USA) ja jäniksen IgG:hen (sc-

2027, Santa Cruz USA). Näytteistä GM130:lla, vimentinillä, sekä hiiren ja jäniksen IgG:llä käsiteltävät sferoidit permeoitiin 0,1% TritonX-PBS- liuoksella 5 min ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen vasta-aineiden epätarkkaa sitoutumista minimoitiin seisottamalla näytteitä 0,3 M glysiinin (G7126, SIGMA, USA), 0,1% naudan seerumi albumiinin (BSA) (A4503 SIGMA, USA), sekä sekundäärivasta-aineen isäntäeläimestä riippuen joko 10% vuohen (16210 Thermo Fisher Scientific, USA), tai 10% aasin seerumin (D9663 SIGMA, USA) PBS- seoksissa 1 tunnin ajan huoneenlämmössä. Poikkeuksena käytetystä protokollasta oli Matrigel™ 2,5U:n päivän 3 viljelymorfologian arvioinnit, joiden IgG -kontrollinäytettä seisotettiin 5% BSA-0,025% Tween-PBS- liuoksessa, minkä jälkeen näyte kaksoisvärjättiin hiiren ja jäniksen IgG:llä johtuen päivän 3 näytteiden vähäisyydestä.

Näytteitä seisotettiin ensimmäisissä vasta-aineissa yön yli +4 C:ssa, minkä jälkeen näytteitä huuhdeltiin PBS:-lla kahdesti. Seuraavaksi näytteitä seisotettiin Alexa Fluor (AF) 488-komplementaari-hiiri tai 594-komplementaari-jänis sekundäärivasta-aineissa (Thermo Fisher, USA) noin 1,5 tunnin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteiden tumat värjättiin DAPI:lla (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, USA).

Näytteet päällystettiin ProLong® Diamond Antifade (Thermo Fisher, USA) -reagenssilla ja peitettiin peitinlasilla. Päällystettyjen näytteiden annettiin kovettua vuorokauden huoneenlämmössä valolta suojattuna ennen siirtämistä +4 C asteeseen. Vasta-ainevärjätty näytteet kuvattiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan Instituutissa Leica DM5000 konfokaalimikroskoopilla (Leica Microsystems, Saksa). Kuvat otettiin sferoidien keskialueelta tai ylempää, välttämällä mahdollisia vääriä positiivisia signaaleita kiinnittyneen sferoidin pohjan alueelta. Hiiren IgG -käsitellyt näytteet toimivat signaali-kontrolleina e-kadheriini ja vimentiini vasta-ainekäsitellyille näytteille, ja jäniksen IgG -näytteet GM130 ja B4-integriini vasta-ainekäsitellyille näytteille.

5.7. PCR -näytteiden keräys ja käsittely

PCR -näytteiden eristyksessä käytettiin Qiagenin RNeasy Mini Kit -pakkausta (Qiagen, Saksa). Matrigel™ -viljelmät sekä NFC:n entsymaattisen hajotuksen jälkeen kerätty solunäytteet pestiin kahdesti PBS:-lla ja hajotettiin n. 300 ul:n RLT-1% β-merkaptotoetanolin (SIGMA, USA) seoksella kaivoa

kohden. Näytteet hajotettiin pipetoimalla 20 kertaa 25G -neulan (BD Microlance, USA) ja 1 ml:n kertakäyttöruiskun (Terumo, Japani) yhdistelmällä, ja säilöttiin -80 C asteeseen.

5.7.1. RNA:n eristys

RNA:n eristyksessä käytettiin Qiagenin RNeasy Mini Kit pakkauksen sentrifuugikolumni -metodin työohjetta ja materiaaleja. RLT -lysaattien annettiin sulaa huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteitä käsiteltiin huoneenlämmössä työohjeen mukaisesti. Kolumneihin sitoutunut RNA eluoitiin 30 ul:lla pakkaukseen kuuluvalla nukleasivapaalla vedellä, minkä jälkeen näytteiden RNA -pitoisuus arvioitiin Spektrofotometri ND-1000 -laitteella (NanoDrop Technologies, Inc, USA) käyttäen NanoDrop1000 3.8.1 -ohjelmistoa, ja RNA-40 -asetuksia. Näytteiden 260/280 absorbanssien suhdeluku vaihteli yleisesti 1,95 -2,07 välillä ja oli alimmillaan 1,86 (LIITE 2, taulukko 2). Eristetty RNA säilöttiin -80 C asteeseen.

5.7.2. Komplementaari-DNA:n valmistus

Komplementaari-DNA:n (complementary DNA; cDNA) valmistuksessa käytettiin High capacity RNA to cDNA kit -valmispakkausta (Thermo Fisher Scientific, USA). Eristetyn RNA:n annettiin sulaa jäällä ja näyteseokset valmistettiin kylminä ennen cDNA -reaktiota. Yhdestä RNA -näytteestä valmistettiin n. 4 cDNA näytettä 20 ul:n tilavuuksissa 345-333ug:sta RNA:ta. cDNA -reaktio tehtiin Bio-RAD T100 Thermal Cycler -laitteella, valmistusajan alkaessa 5 min ajan +95C:lla, minkä jälkeen lämpötila laskettiin +37 C:n 1 tunnin ajaksi. Reaktiolle oletettiin 1:1 RNA-cDNA tuottosuhde. Syntynyt cDNA jäädytettiin + 4 C asteeseen, ja jokaisesta näytteestä valmistetut cDNA -reaktioputket yhdistettiin yhdeksi liuokseksi, josta laimennettiin nukleasivapaalla vedellä (Ambion 9938, Thermo Fisher Scientific, USA) 8,333 ng/ul -pitoista cDNA käyttöliuosta. Käyttöliuos jaettiin 20 ul:n tilavuuksissa eppendorf-putkiin ja säilöttiin -20C asteeseen.

5.7.3. PCR alukkeet

Tarkasteltavien geenien kaikki mRNA -variantit etsittiin NCBI:n RefSeq -palvelusta. Varianttien fastasekvenssit linjattiin ensin EMBL-EBI:n MUSCLE -ohjelmalla asetuksella ClustalW strict, minkä jälkeen yhtenevästi linjautuneista sekvenssialueista pyrittiin valitsemaan kirjallisuuden perusteella ainoastaan merkitykselliset variantit sisältävä sekvenssialue, jota käytettiin suunnitteluohjelman materiaalina. PCR -alukkeet suunniteltiin käyttämällä NCBI:n RefSeq -tietopankin Pick primers- alukkeiden suunnitteluohjelmaa. Alukesuunnittelun oletusarvoisia hakukriteereitä tarkennettiin seuraaviksi: PCR – tuotteen maksimikoko 200 emäsparia, BLAST E-arvo 100 ja sanakoko 10. Suunnitteluohjelman ehdottamien alukeparien rakenteet tarkistettiin PREMIER Biosoftin online -ilmaisohjelmalla. Työssä käytetyt alukkeet olivat: c-FLIP-L/(CFLAR) (variantit 1,2,4,5,6,7,8,9) FW: GCTTTGTGTGTGTCCTGGTG, RW: GGAGCCCTGAGTGAGTCTGA, Bim(EL)/ (BCL2L11) (variantit 1,2,4,13,X1,X2,X12,X13) FW: TTTGACACAGACAGGAGCCC, RW: CCAATACGCCGCAACTCTTG, β 1-integriini (ITGB1) (variantit 1A,1D, 1E) FW: AGGAATGTTCACGGCTGCT, RW: CAATGCCACCAAGTTTCCCA. Referenssigeeninä käytetyn β 2-mikroglobuliinin alukkeet vastaanotettiin lahjoituksena Raili Koivuniemeltä, ja alukkeiden sekvenssit olivat FW: CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG, RW: GCTTACATGTCTCGATCCCACT. Alukkeet tilattiin Invitrogeniltä (Thermo Fisher Scientific, USA), ja pakastekuivatut alukkeet liuotettiin huoneenlämmössä nukleasivapaaseen veteen 100 uM pitoisuuteen, joista edelleen valmistettiin 10 uM käyttöliuokset. Alukkeet säilöttiin -20 C asteeseen. Alukkeiden suunnitteluvaiheet LIITE 3.

5.7.4. Reaaliaikainen PCR -reaktio

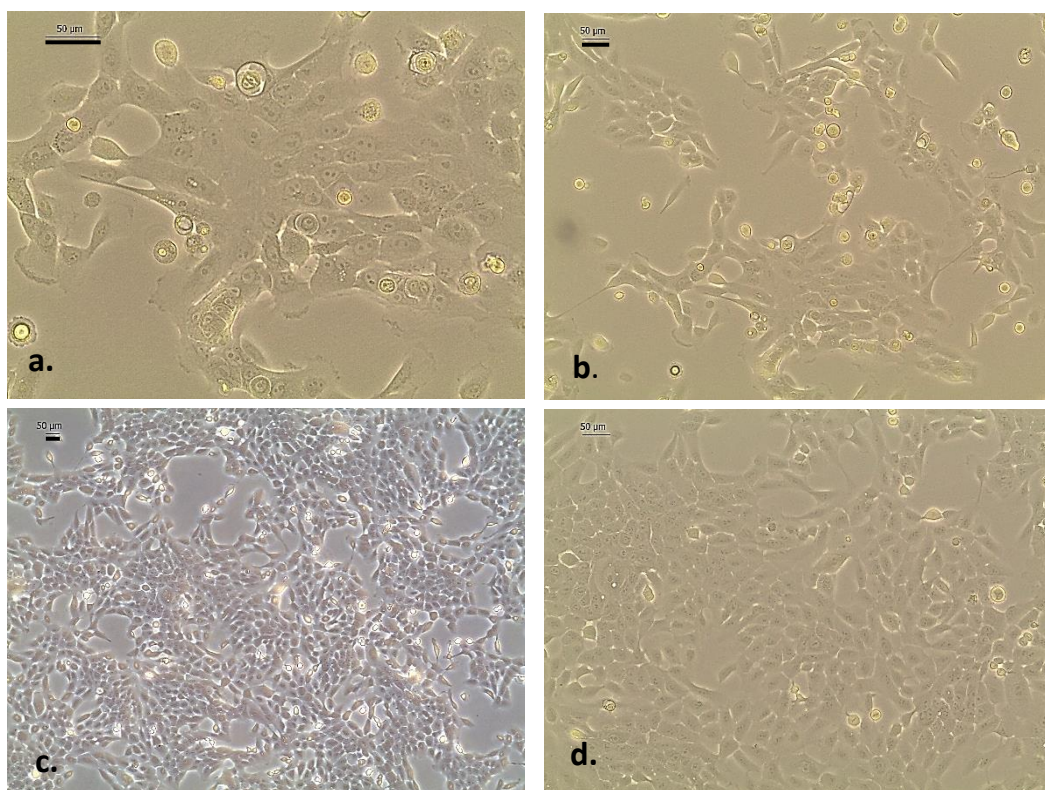
Reaaliaikainen PCR (qPCR) -reaktio tehtiin Applied Biosystems:in StepOne Plus -laitteella (Applied Biosystems™, USA) käyttäen kvantitatiivinen - suhteellinen standardisuora, SYBR Green reagents, ja Fast ramp speed -asetuksia StepOne Software v2.3 ohjelmalla. Reaktiokaivot rakennettiin Applied Biosystems Fast SYBR Green MasterMix (Thermo Fisher Scientific, USA) -menetelmäpakkauksen reagensseilla, Applied Biosystems:in 4346906 -kuoppalevyille (Thermo Fisher Scientific, USA). Kaikkien näytteiden qPCR -ajoissa käytettiin kaivotriplikaatteja. Ajon asetuksina pidettiin +95 C /

30s alukkeiden erottamiseksi, jonka jälkeen 40 sykliä asetuksilla: +95 C / 3s, +55 C / 15s (β 2-mikroglobuliini, Bim(EL)), tai +52 C / 15s (β 1 integriini), tai +53 C / 15s (c-FLIP-L); sekä +72 C / 10s uusien tuotteiden viimeistelemiseksi, ja +95 C / 15s alukkeiden erottamiseksi ennen uutta sykliä. Ajojen lopussa lopputuotteita seisoitettiin +60 C:ssa / 60s ajan syntyneiden tuotteiden viimeistelemiseksi, ja lopuksi +95 C / 15s alukkeiden erottamiseksi, ja erkanemislämpötilan kuvaajan havainnoimiseksi. Alukkeiden sitoutumislämpötilat (T_a) laskettiin Thermo Scientific:in online ilmaisohjelmalla asetuksilla: Taq-polymeraasi, yksittäiset alukkeet, 0,1 uM alukepitoisuus. QPCR -ajojen raakadata LIITE 3.

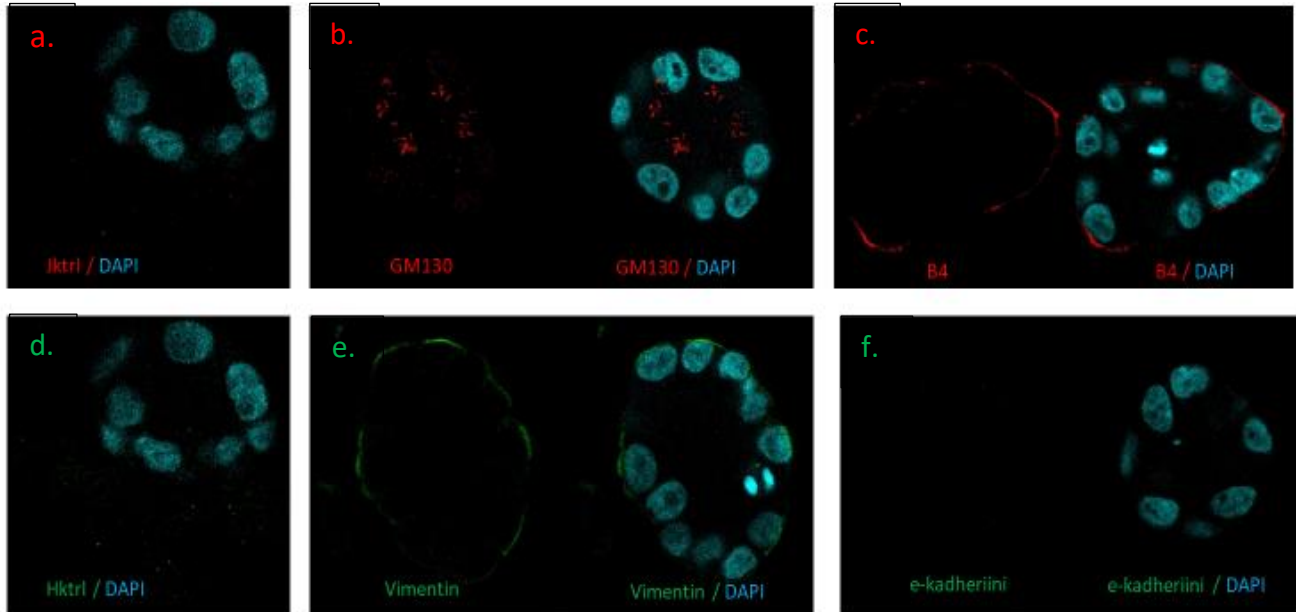
6. Tulokset

6.1. Käytetyn MCF 10A:n viljelymorphologia vastasi vertaisjulkaisujen kuvausta linjasta

MCF 10A:n 2U -ylläpitoviljelmien morfologia näytti valmistajan kuvauksen mukaiselta sulatuksen jälkeen jaolla 7 (kuva 2: a, b), ja säilytti viljelymorphologiansa jaolle 11 ennen siirrostusta kokeellisiin 3U-olosuhteisiin (kuva 2: c, d) (*ATCC, Debnath ym. 2003*). Käytetyn solulinjan mahdolliset koeasettelun kannalta haitalliset viljelysopeumat tarkistettiin myös toiminnallisella 2,5U -viljelykokeella tunnetusti polarisoituneita sferoideja tuottavassa Matrigel™ -alustassa. MCF 10A muodosti onttoja sferoideja Matrigel™:ssä jo päivänä 3, jolloin myöskin oli havaittavissa GM130-Golgi proteiinin sijoittuminen polarisoituneiden solujen ontelon puoleiselle sivulle (kuva 3: b). Integriinidimeeri- α 6 β 4:n β 4-alayksikkö sijoittui epiteelisolujen basaaliselle pohjakuoren kontaktipinnalle sferoidin ulkopuolelle (kuva 3: c). Liikkuvalle solukolle tyypillistä vimentini -välifilamenttia havaittiin sferoidin ulkopinnalla (kuva 3: e), ja e-kadheriinin ilmentämistä ei ollut havaittavissa (kuva 3: f).



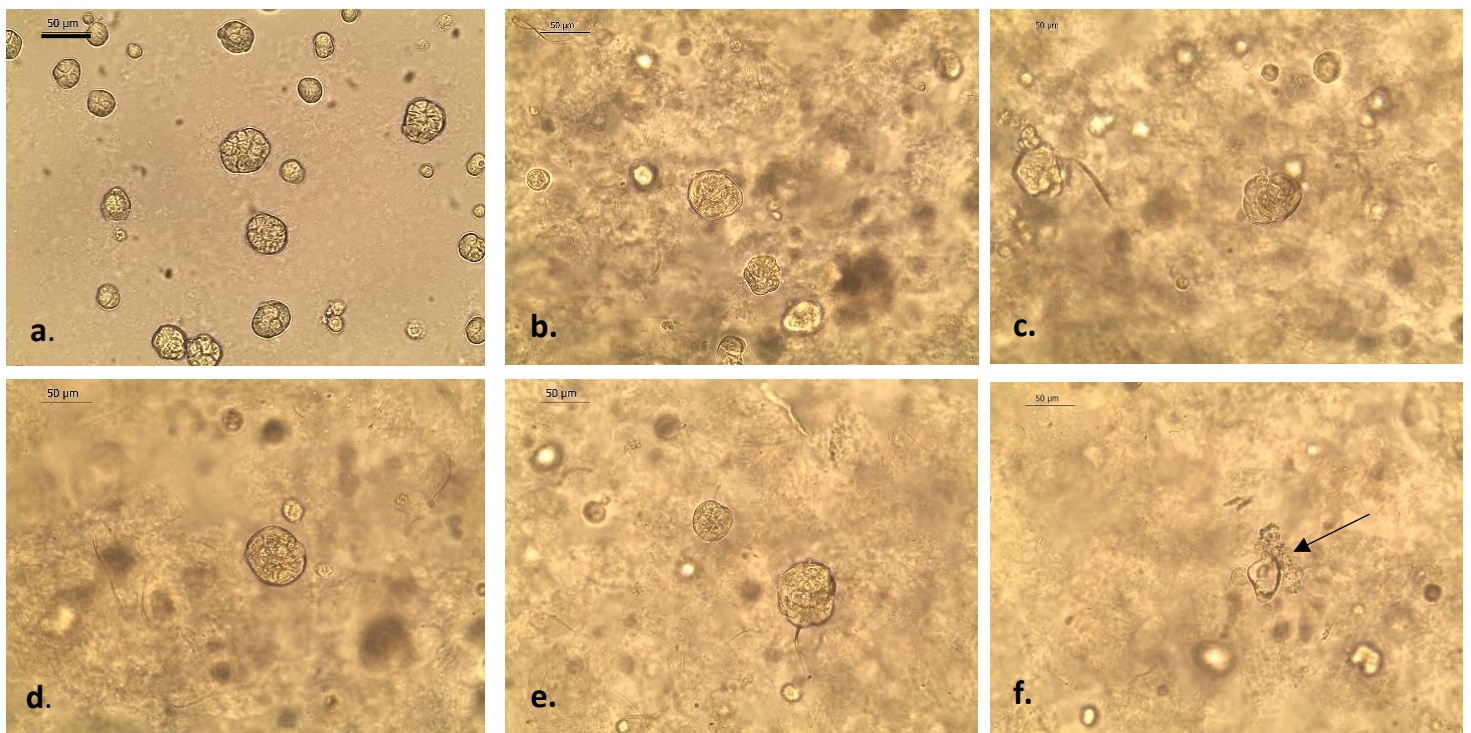
Kuva 2. MCF 10A:n 2U -ylläpitoviljelmät DMEM -pohjaisessa elatusnesteessä sulatuksen jälkeen jaolla 7 (**a,b**). 2U -viljelmien morfologia pysyi muuttumattomana jaolla 11 ennen siirrostusta 2,5U-Matrigel™:hin sekä NFC -olosuhteisiin (**c,d**). Kuvien skaalaus 50 µm.



Kuva 3. 2,5U-Matrigel™:ssä kasvatettuja MCF 10A -sferoideja päivänä 3. Näytteiden signaalit normalisoitiin jäniksen ja hiiren IgG vasta-aineilla käsiteltyjen sferoidien AF594 - anti -jänis (a) ja 488 - anti -hiiri (d) signaaleilla, joista jäniksen IgG toimi GM130:n (b) ja β4 integriinin (c) kontrollina, ja hiiren IgG ja vimentiniin (e) ja e-kadheriinin (f) kontrollina. GM130 -signaali sijoittui sferoidin epiteelin apikaaliselle, ja β4-integriini basaaliseksi puolelle. Päivänä 3 sferoidit antoivat positiivisen vimentin -signaalin sferoidin ulkopinnalla. E-kadheriinia ei ollut havaittavissa.

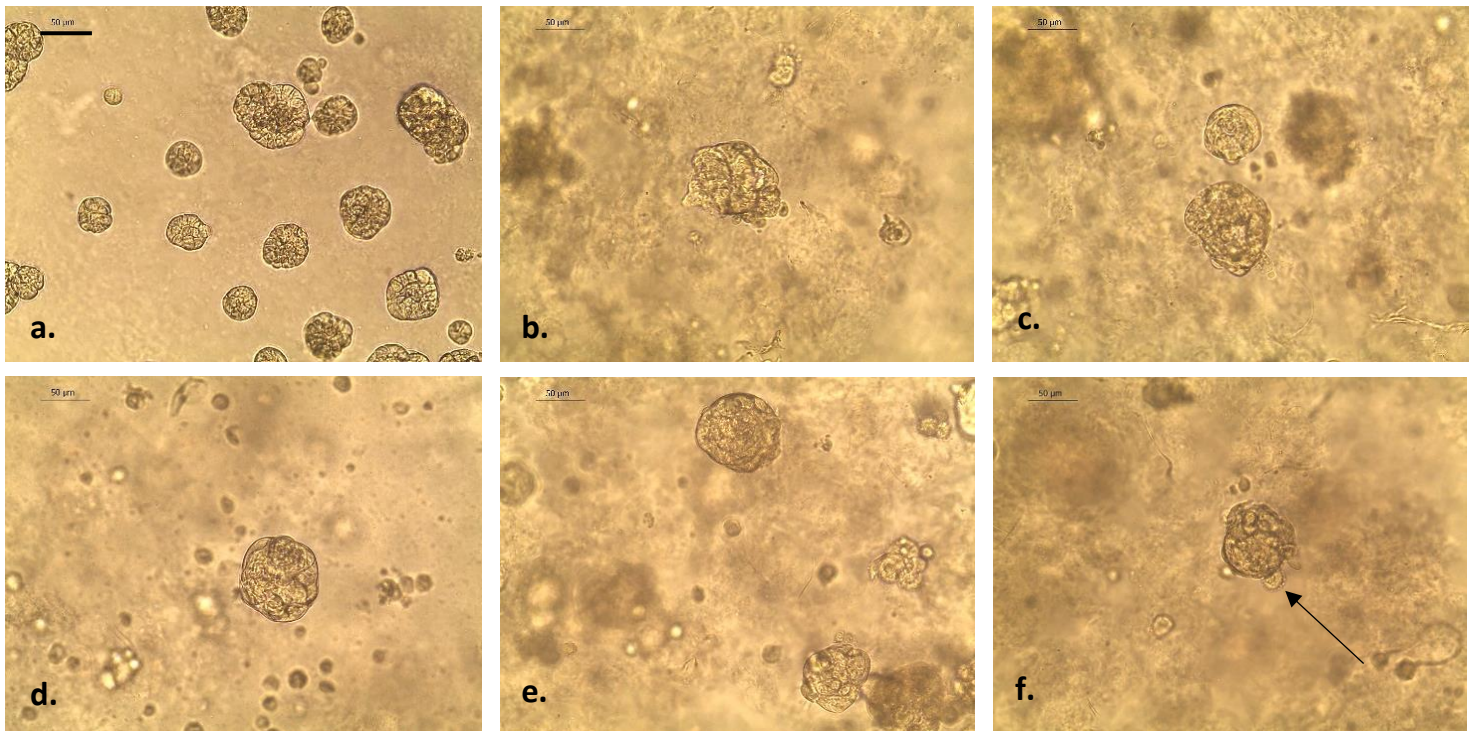
6.2. NFC-LAM-111 -sferoidien pintarakenteessa samankaltaisuutta Matrigel™ -näytteiden kanssa

NFC -viljelmien sferoidien koon kehitys käynnistyi vasta noin 10. viljelypäivän jälkeen, ja päivänä 15 NFC-olosuhteiden välillä oli huomattavissa eroja sferoidien koossa, kokojakaumassa sekä pinnan muodoissa. Natiivi-NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa oli laajempaa koon ja muodon vaihtelua (kuva 4: b, c) kuin NFC-LAM-111 -viljelyssä sferoideissa (kuva 4: d, e). Lisäksi NFC-LAM-111 -kasvatettujen sferoidien muoto ja pinnan rakenne muistutti enemmän Matrigel™-viljelmien säännöllisen pyöreää rakennetta ja polarisoituneiden sferoidien poimuttunutta pintaa (kuva 4: a, d). Sferoidien koot pysyivät noin 50-80 µm:n rajoissa kaikissa olosuhteissa. Kaikissa NFC -viljelmissä oli havaittavissa satunnaista apoptoosia (kuva 4: f.).



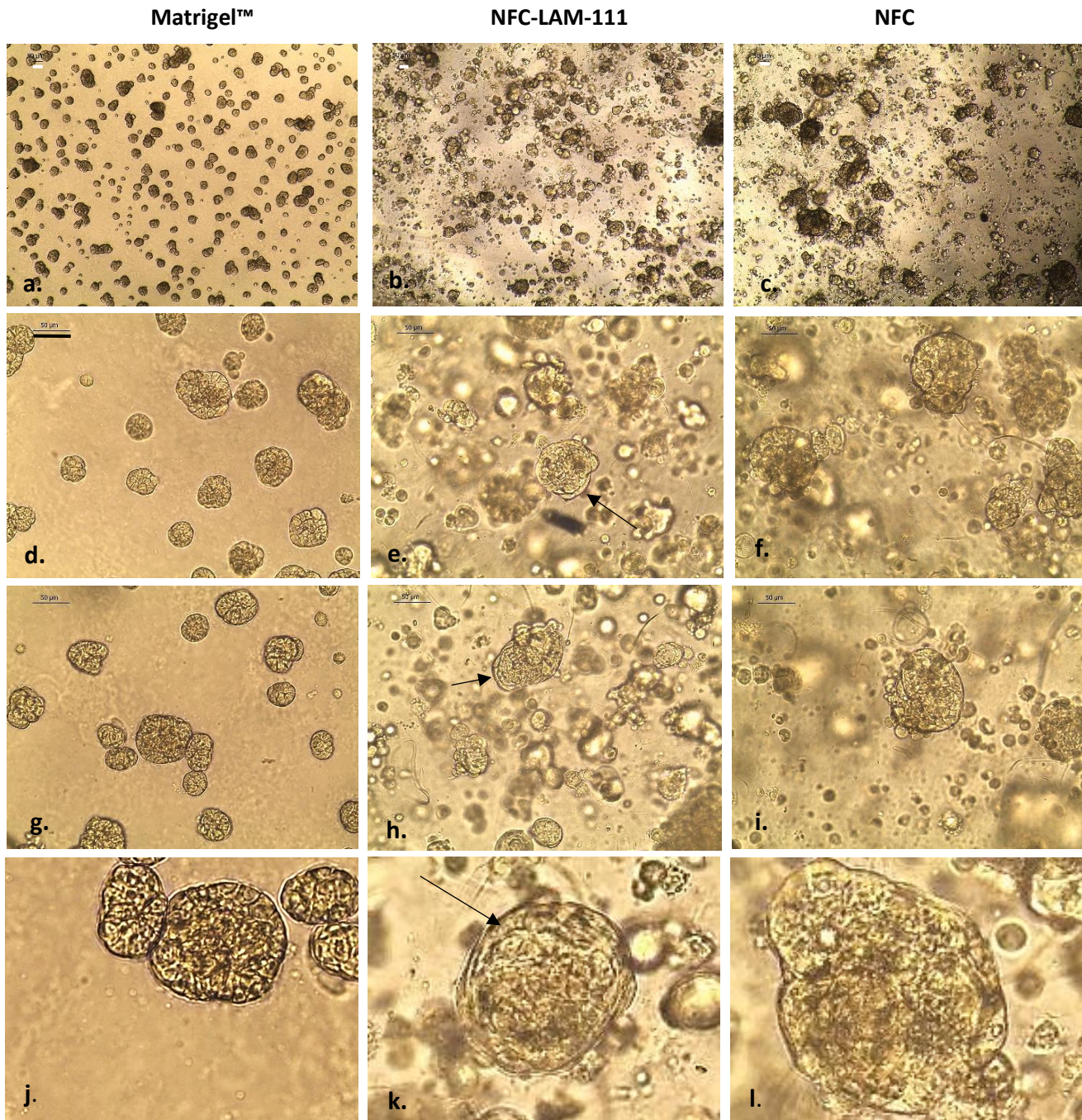
Kuva 4. MCF 10A:n 3U -viljelmien morfologia päivänä 15. Matrigel™-2,5U -viljelmien sferoideissa havaittiin polarisoituneen epiteelin poimuttunut ja tiivis pinta, sekä homogeenisesti pyöreähkö muoto (a). NFC-3U -viljelmissä havaittiin epäsäännöllisyyksiä sferoidien muodossa ja pinnan yhtenäisyydessä (b,c). NFC-LAM-111 -viljelmien sferoideissa havaittiin useasti tiivis, pyöreä muoto, sekä korostunutta epiteelipinnan poimuttumista (d,e). Kaikissa NFC-3U -viljelmissä havaittiin satunnaista apoptoottista solukuolemaa (f). Kuvien skaalaus 50 µm.

Viljelyn päättyessä päivänä 28, erot NFC -olosuhteiden välillä pysyivät jossain määrin ennallaan. Natiivi-NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa oli enemmän keskinäistä vaihtelua; sferoidien muoto oli epäsäännöllinen vaihdellen kulmikkaasta pyöreähkään, minkä lisäksi oli havaittavissa sferoidien kyljestä kasvavaa rakennetta (kuva 5: b, c). NFC-LAM-111 -kasvaneissa sferoideissa oli edelleen nähtävissä melko tasainen muoto -ja kokojakauma, jossa tiivis pyöreä muoto oli yleisimmin havaittu (kuva 5: d, e). Pinnan muotojen erot NFC -olosuhteiden välillä eivät olleet yhtä korostuneet kuin päivän 15 aikapisteessä, ja apoptoottisia sferoideja oli edelleen havaittavissa molemmissa NFC -olosuhteissa (kuva 5: f). Matrigel™ -viljelmät säilyttivät päivän 15 morfologiansa (kuva 5: a)..



Kuva 5. MCF 10A:n 3U -viljelmien morfologia päivänä 27-28. Matrigel™-2,5U -viljelmien sferoideissa oli edelleen havaittavissa polarisoituneen epiteelin poimuttunut ja tiivis pinta (a). NFC-3U -viljelmissä aikaisemmin havaitut epäsäännöllisyydet sferoidien muodossa ja pinnan yhtenäisyydessä olivat korostuneet, ja sferoidien kyljissä havaittiin satunnaista versovaa kasvua (b,c). NFC-LAM-111 viljelmien sferoideissa havaittiin vallitsevana edelleen tiivis, pyöreä muoto ja poimuttunut epiteelipinta (d,e). Kaikissa NFC-3U -viljelmissä havaittiin edelleen satunnaista apoptoottista solukuolemaa etenkin kaivojen pohjalla (f). Kaikissa viljelmissä havaittiin vähäistä koon kasvua verraten päivän 15 sferoideihin. Kuvien skaalaus 50 µm.

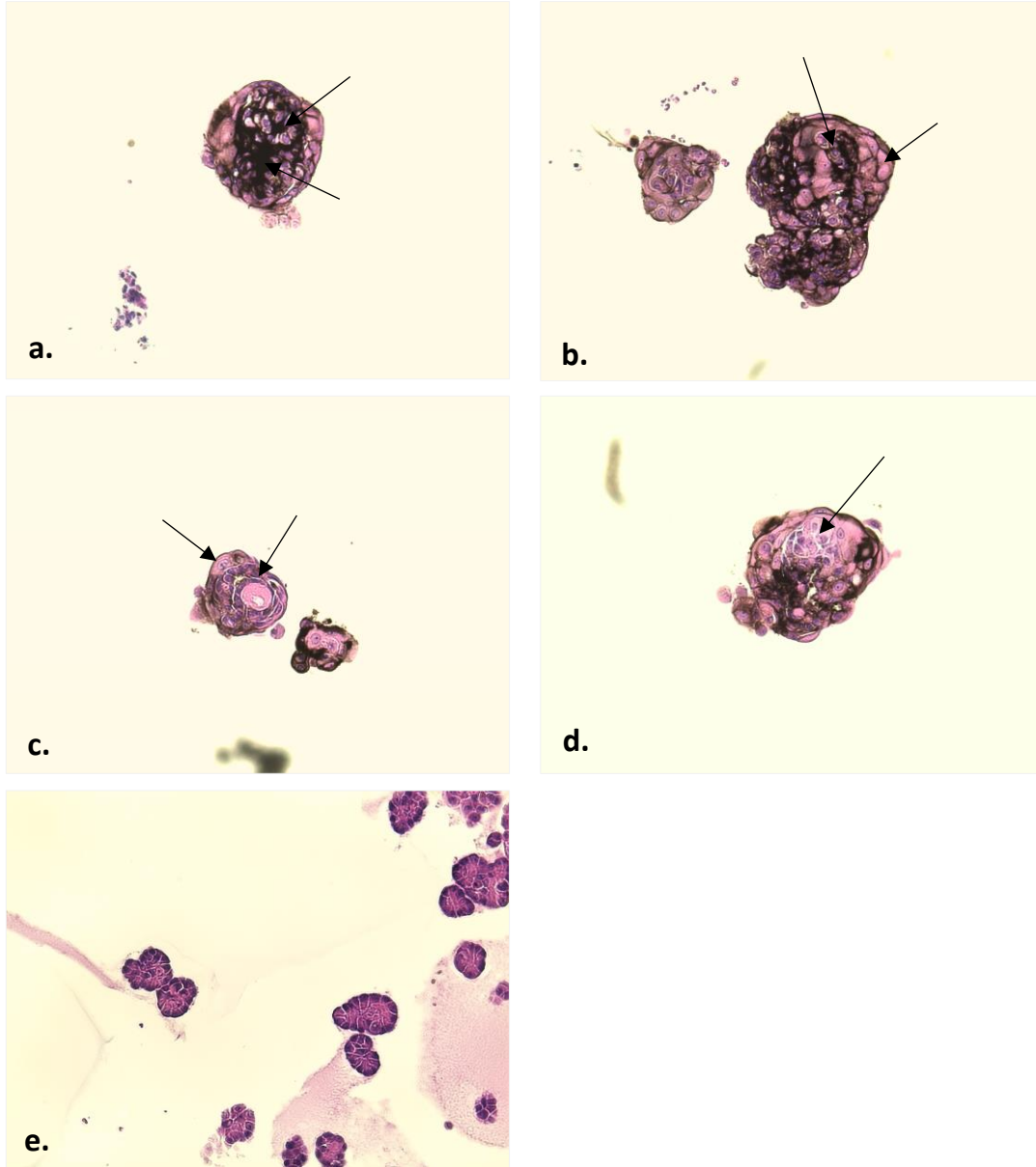
NFC -kasvualustojen entsymaattisen hajotuksen jälkeen rinnakkaisten viljelyolosuhteiden tuottamien sferoidien koon vaihteluiden erot näkyivät selkeämmin (kuva 6: a, b, c), ja lisäksi NFC-LAM-111 -alustan havaittiin tuottavan ylimääräisestä solukerroksesta muodostuvan kotelon sferoidin ympärille (kuva 6: e, h, k). Ilmiö mahdollisesti esiintyi natiivi-NFC:ssä vähäisemmässä määrin (kuva 6: f, i; kuva 7: a), eikä kyseistä rakennetta havaittu Matrigel™:ssä kasvaneissa sferoideissa (kuva 6: d, g, j). Kaikissa olosuhteissa oli havaittavissa monikystisiä sferoideja (LIITE 4).



Kuva 6. MCF 10A:n sferoidien morfologia päivänä 28 Matrigel™-2,5U -viljelmissä (a,d,g,j), sekä NFC-LAM-111 (b,e,h,k) ja NFC (c,f,i,l) -viljelmissä yli yön entsyymikäsittelyn jälkeen. NFC:n poistuttua NFC-LAM-111 -viljelmien sferoidien kokojakauma (b) muistutti enemmän Matrigel™ -viljelmien sferoideja (a), kuin natiivi-NFC:n sferoideja (c). NFC-LAM-111 -sferoideissa oli havaittavissa kotelomainen, erillinen solukerros sferoidin pinnalla (e,h,k), jonka havaitseminen natiivi-NFC:ssä oli tulkinnallista (f,i), ja puuttui Matrigel™ -viljelmistä (d,g,j). 20 -kertaisessa suurennoksessa solukerroksen läsnäolo oli erityisen selkeä NFC-LAM-111 -alustan sferoideissa (k) verraten Matrigel™ -olosuhteeseen (j) tai natiivi-NFC -olosuhteeseen (l). Kuvien skaalaus 50 μm.

6.3. Hematoksyliini-Eosiini -halkaisuvärjäyksissä havaittiin polykystisyyttä NFC viljelmissä

Hematoksyliini – Eosiinivärjäykset tehtiin päivänä 28 kerättyjen sferoidien parafiinileikkeistä. Matrigel™:ssä kasvatetut sferoidit sisälsivät onton luumenin, jota ympäröi ympäröi yhden solukerroksen epiteeli (kuva 7: e). Natiivi-NFC:ssä kasvaneet sferoidit olivat epäsäännöllisiä ja näyttivät sisältävän useita onteloita ja solukerroksia, sekä uloimman kotelomaisen solukerrostuman (kuva 7: a, b). NFC-LAM-111 -kasvatetussa sferoidipopulaatiossa oli pienempiä, onttoja sferoideja (kuva 7: c), sekä suurempia ja epäsäännöllisen rakenteen omaavia kasvannaisia (kuva 7: d). Myös NFC-LAM-111 -sferoideissa havaittiin erityisen korostunut kotelomainen solukerros onteloita ympäröivien solujen päällä (kuva 7: c). NFC -sferoidien halkaisuleikkeissä näkyi poikkeuksellisesti rakenteiden sisään päässyt pintamuste (kuva 7: a, b, d), joka häiritsi jossain määrin tulosten tulkintaa.



Kuva 7. HE -värjätty halkaisuleikkeet päivän 28 MCF 10A -sferoideista. Poikkeuksellisesti sferoidien sisälle kulkeutunut pintavärjäyksessä käytetty histologinen muste merkitsee NFC -olosuhteiden kuvissa sferoidien luumenia (**a,b,d**). Natiivi-NFC:ssä kasvatetuissa sferoideissa oli havaittavissa monikystisiä luumeneita (**a**), joita ympäröivät HE -värjäytymien perusteella erityyppisistä soluista muodostuneet, kaksinkertaiset rakenteet (**b**). NFC-LAM-111 -olosuhteissa kasvaneissa sferoideissa esiintyi pienikokoisia, onttoja, yhden luumenin sferoideja, joissa kuten natiivi-NFC:ssä, oli havaittavissa ylimääräisiä, mahdollisesti kahdenlaisista soluista muodostuneita solukerroksia luumenin muodostavien solujen päällä (**c**). Myös NFC-LAM-111 -kasvatetuissa sferoideissa esiintyi epäsäännöllisesti järjestäytyneitä kasvannaisia (**d**). Matrigel™:ssä kasvatetuissa sferoideissa havaittiin yksinkertaisen epiteelikerroksen ympäröivä ontto lumeni (**e**).

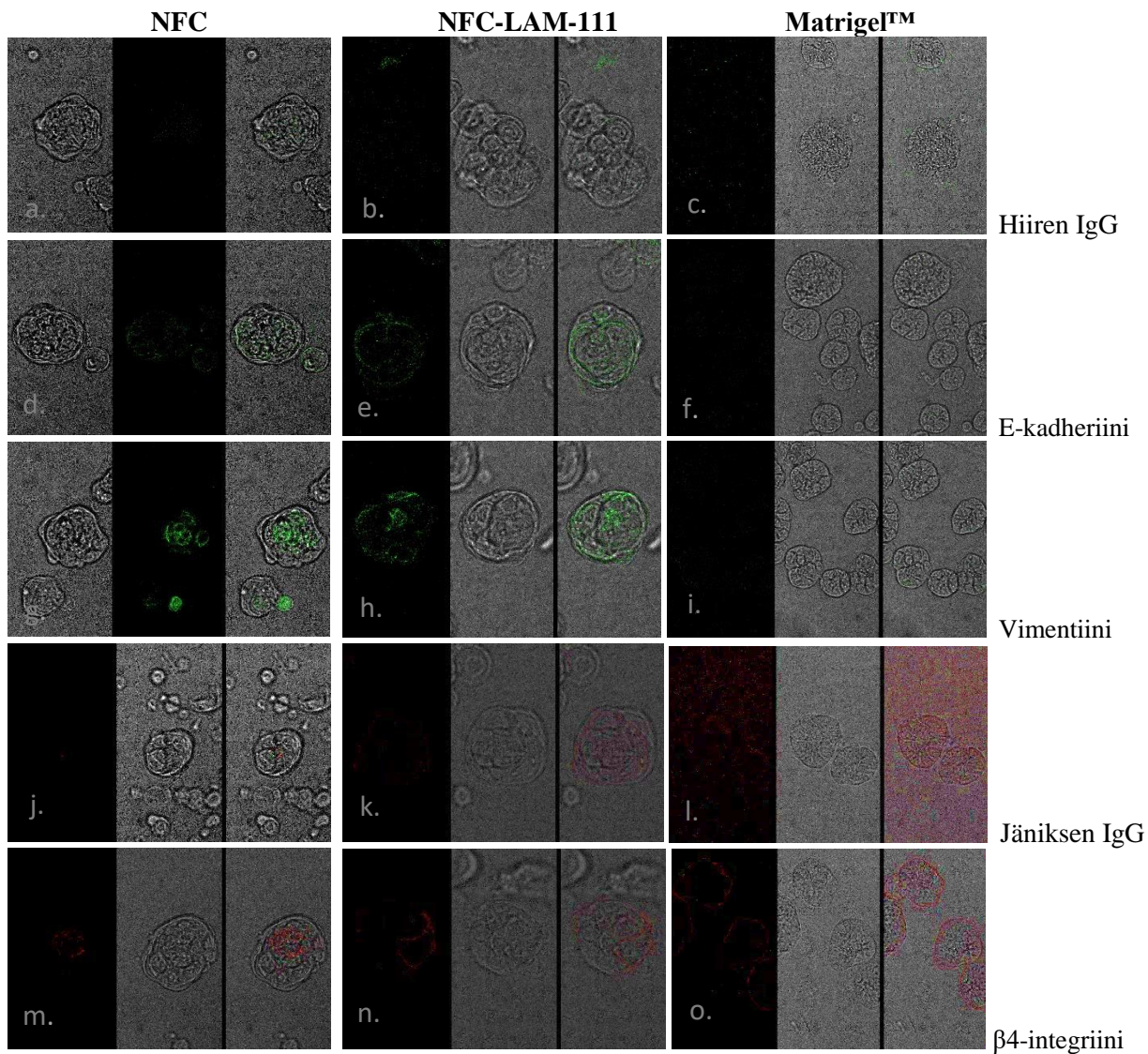
6.4. E-kadheriinin, vimentiinin ja $\beta 4$ -integriinin rakenteellinen sijoittuminen sferoideissa

E-kadheriinin, vimentiinin sekä $\beta 4$ -integriinin ilmentymistä ja sijoittumista sferoidien rakenteissa arvioitiin vasta-ainevärjäyksillä olosuhteiden välillä päivinä 15 (kuva 8) ja 28 (kuva 9).

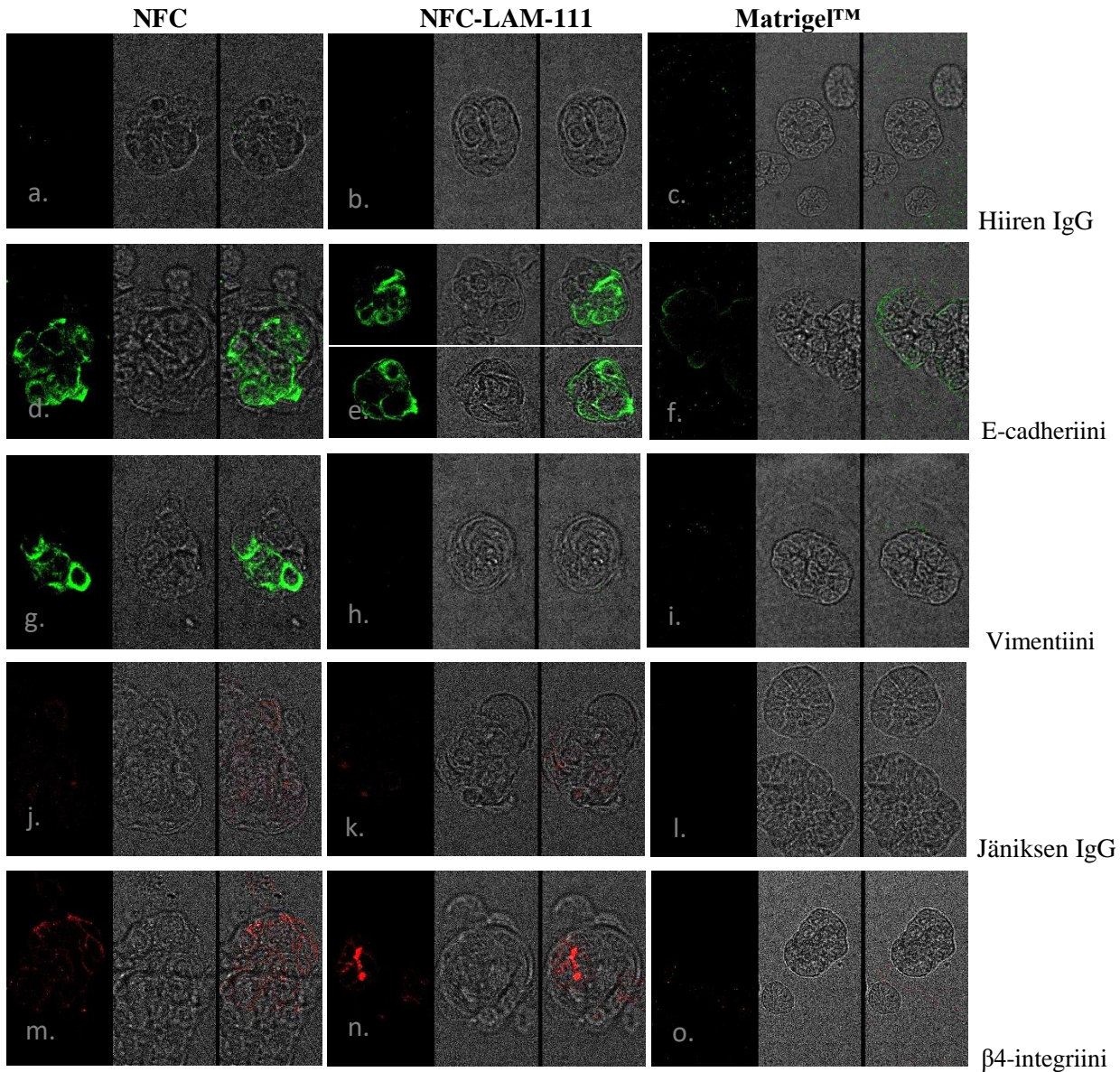
Päivänä 15 e-kadheriini antoi positiivisen signaalin molemmissa NFC -olosuhteiden viljelmissä. Positiivinen e-kadheriini sijoittui NFC -kasvuolosuhteiden sferoideissa eri rakenteisiin, jolloin natiivi-NFC:n sferoidien solujen välillä oli yleisesti havaittavissa heikohko positiivinen signaali (kuva 8: d), ja NFC-LAM-111 -sferoideissa e-kadheriini näytti sen sijaan sijoittuvan sferoidin uloimman solukeroksen ja sisemmän solumassan väliseen tilaan (kuva 8: e). E-kadheriinin ilmentämistä ei havaittu Matrigel™:ssä kasvaneissa sferoideissa päivänä 15 (kuva 8: f). Vimentiini oli positiivinen ja eri rakenteisiin sijoittuneena molemmissa NFC-alustojen näytteissä. Natiivi-NFC:n sferoideissa vimentiniä havaittiin yksittäisissä soluissa ja sferoidin keskiosassa (kuva 8: g), ja NFC-LAM-111 -seoksessa viljellyissä sferoideissa vimentiini sijoittui kehämäisesti sferoidin ulkopinnan soluihin (kuva 8: h). Vimentiini oli negatiivinen Matrigel™:ssä kasvatetuissa sferoideissa (kuva 8: i). $\beta 4$ -integriinin ilmentyminen oli positiivinen kaikissa olosuhteissa; sijoittuen sferoidin sisäsolukkoon natiivi-NFC:ssä kasvatetuissa näytteissä (kuva 8: m), sferoidin pinnan solujen väleihin NFC-LAM-111 -alustan näytteissä (kuva 8: n), ja sferoidien pinnalle Matrigel™:ssä kasvatetuissa näytteissä (kuva 8: o).

Päivänä 28 e-kadheriinia oli havaittavissa kaikissa näytetyypeissä. Natiivi-NFC:n sferoideissa e-kadheriinia havaittiin sisäosan solukoissa (kuva 9: d). NFC-LAM-111 -sferoideissa e-kadheriinia havaittiin erillisissä sferoideissa joko sisäosan solukoissa tai sferoidien pinnan soluissa (kuva 9: e), ja Matrigel™:ssä e-kadheriini sijoittui sferoidien pinnalle (kuva 9: f). Positiivinen vimentiinin ilmentyminen havaittiin ainoastaan natiivi-NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa (kuva 9: g). $\beta 4$ -integriinin ilmentäminen oli päivänä 28 satunnaisesti havaittavissa solujen väleissä molemmissa NFC-olosuhteiden sferoideissa (kuva 9: m, n), ja negatiivinen Matrigel™ -näytteissä (kuva 9: o).

DAPI värjäys ei tuottanut onnistunutta signaalia mistään näytetyypistä päivinä 15 ja 28.



Kuva 8. Päivän 15 e-kadheriinin, vimentiiniin ja $\beta 4$ -integriinin ilmentäminen ja rakenteellinen sijoittuminen NFC:ssä, NFC-LAM-111:ssä sekä Matrigel™:ssä kasvatetuissa MCF 10A -sferoideissa. E-kadheriini oli heikko ja havaittavissa tasaisesti NFC-olosuhteen sferoidien solukossa (**d**), sekä sijoittuneena ytimen solukon ja ympäröivän solukerroksen väliin NFC-LAM-111 -sferoidissa (**e**). E-kadheriinia ei ollut havaittavissa Matrigel™ -olosuhteessa päivänä 15 (**f**). Vimentiiniä ilmentyi sferoidin keskiosan solukossa NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa (**g**), sferoidin ulkopinnan soluissa NFC-LAM-111 -olosuhteessa (**h**), eikä ollut havaittavissa Matrigel™ olosuhteessa (**i**). $\beta 4$ -integriinin havaittiin sijoittuvan sferoidin keskiosan soluihin NFC -olosuhteen sferoideissa (**m**), sferoidin pinnan solujen väleihin NFC-LAM-111 -sferoideissa (**n**), ja sferoidin ulkopinnalle Matrigel™:ssä kasvaneissa sferoideissa(**o**). Näytteiden signaalit normalisoitiin jäniksen ja hiiren IgG-vasta-aineilla käsiteltyjen sferoidien AF 488 – anti -hiiri (**a,b,c**) ja 594 – anti -jänis signaaleilla (**j, k, l**), joista hiiren IgG toimi e-kadheriinin ja vimentiinin kontrollina, ja jäniksen IgG $\beta 4$ -integriinin kontrollina.



Kuva 9. Päivän 28 e-kadheriinin, vimentiinin ja $\beta 4$ -integriinin ilmentäminen ja rakenteellinen sijoittuminen 3U - sferoideissa. E-kadheriini sijoittui NFC:ssä viljellyissä sferoideissa kaikkialle keskiosan solukossa (d), ja NFC-LAM-111 -olosuhteessa joko kehämäisesti pinnan soluihin tai keskiosan solukoon (e). Matrigel™:ssä kasvaneissa sferoideissa oli havaittavissa heikko e-kadheriinin signaali sferoidin pinnalla (f). Vimentiiniä ilmentyi ainoastaan natiivi-NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa päivänä 28 (g). B4-integriiniä ilmentyi NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa heikosti solujen väleissä (m), ja NFC-LAM-111:ssä satunnaisesti mahdollisesti pinnan solujen välissä (n). $\beta 4$ -integriinin ilmentämistä ei havaittu Matrigel™ näytteissä päivänä 28 (o). Näytteiden signaalit normalisoitiin jäniksen ja hiiren IgG vasta-aineilla käsiteltyjen sferoidien AF 488 – anti -hiiri ja 594 – anti -jänis ja signaaleilla, joista hiiren IgG e-kadheriinin ja vimentiinin kontrollina (a,b,c) ja jäniksen IgG toimi B4-integriinin kontrollina (j,k,l).

6.5. Reaaliaikainen PCR -analyysi Bim:in, c-FLIP-L:n sekä $\beta 1$ -integriinin mRNA:n tuotoista

Viljelmien mRNA:n tuoton muutoksia vertailtiin olosuhteiden ja aikapisteiden välillä. Tarkastelun kohteena olivat apoptoottisesta luumenin tyhjennyksestä vastaavan Bim (EL):in, apoptoosilta suojaavan c-FLIP-L:n, sekä polarisoitumistapahtumassa solun sisäisten mikroputkien ja Golgin laitteen uudelleensijoittumista säätelevän $\beta 1$ -integriinin mRNA:n ilmentymistasojen muutokset. Referenssigeeninä käytettiin $\beta 2$ -mikroglobuliinia, jonka näytekohtaisen ilmentymisen kymmenkantaiseen logaritmiarvoon normalisoitiin näytteistä analysoitavien geenien ilmentymisten kymmenlogaritmiset arvot, saaden näin olosuhteiden ja aikapisteiden väliset geenien ilmentymisten muutokset logaritmiarvojen suhdannekertoimina (LIITE3).

NFC -viljelmien verrokkiolosuhteina toimivat Matrigel™-3U, sekä perinteisellä kudokäsittelystä muovialustalla viljelty 2U -viljelmä. Tulokset osoittavat molempien NFC -olosuhteiden viljelmien geenien ilmentymisen poikkeavan Matrigel™:ssä kasvaneiden sferoidien säätelystä, mutta noudattavan keskenään samankaltaista kasvurytmiä. Matrigel™ -viljelmien mRNA:n tuottohuiput sijoittuivat selkeästi päiviin 6 ja 28. Molempien NFC-pohjaisten 3U -viljelmien mRNA:n tuottohuiput mukailivat Matrigel™ -olosuhteessa kasvatettujen sferoidien mRNA:n ilmentymisten profiilia, mutta sijoittuvat päivään 28, lukuun ottamatta hyvin vähäistä geenien ilmentymisen nousua päivänä 6 natiivi-NFC viljelmissä.

$\beta 1$ -integriini

$\beta 1$ -integriinin alukkeiden tehokkuus oli 74,73% ja reaktion lopputuotteiden erkanemislämpötilan kuvaaja näytti vähäisen määrän mahdollista kontaminanttia näytteissä 2U sekä päivän 28 Matrigel™ -näyte. $\beta 1$ -integriinin tuotto kohosi Matrigel™ -olosuhteessa päivänä 6 vähintään 30%, ja enintään 46% verraten muihin aikapisteisiin, sekä kohosi myös vähäisesti päivänä 28. Molempien NFC -viljelmien $\beta 1$ -integriinin tuotto pysyi hyvin matalalla tasolla päivinä 3,6 ja 15, kohoten päivänä 28 noin 30-50% (NFC) ja 6-23% (NFC-LAM-111); kuitenkin vain lähes 2U -viljelmien ilmentämisen tasolle.

Verrattaessa Matrigel™ -ja NFC -viljelmien $\beta 1$ -integriinin lähetti-RNA:n erityshuippuja, oli Matrigel™:ssä kasvaneiden sferoidien korkein $\beta 1$ -mRNA:n tuoton lisäys ainakin 50 % suurempi verraten NFC -viljelmien tuottopiikkeihin (kuvaaja 1: b).

Bim(EL)

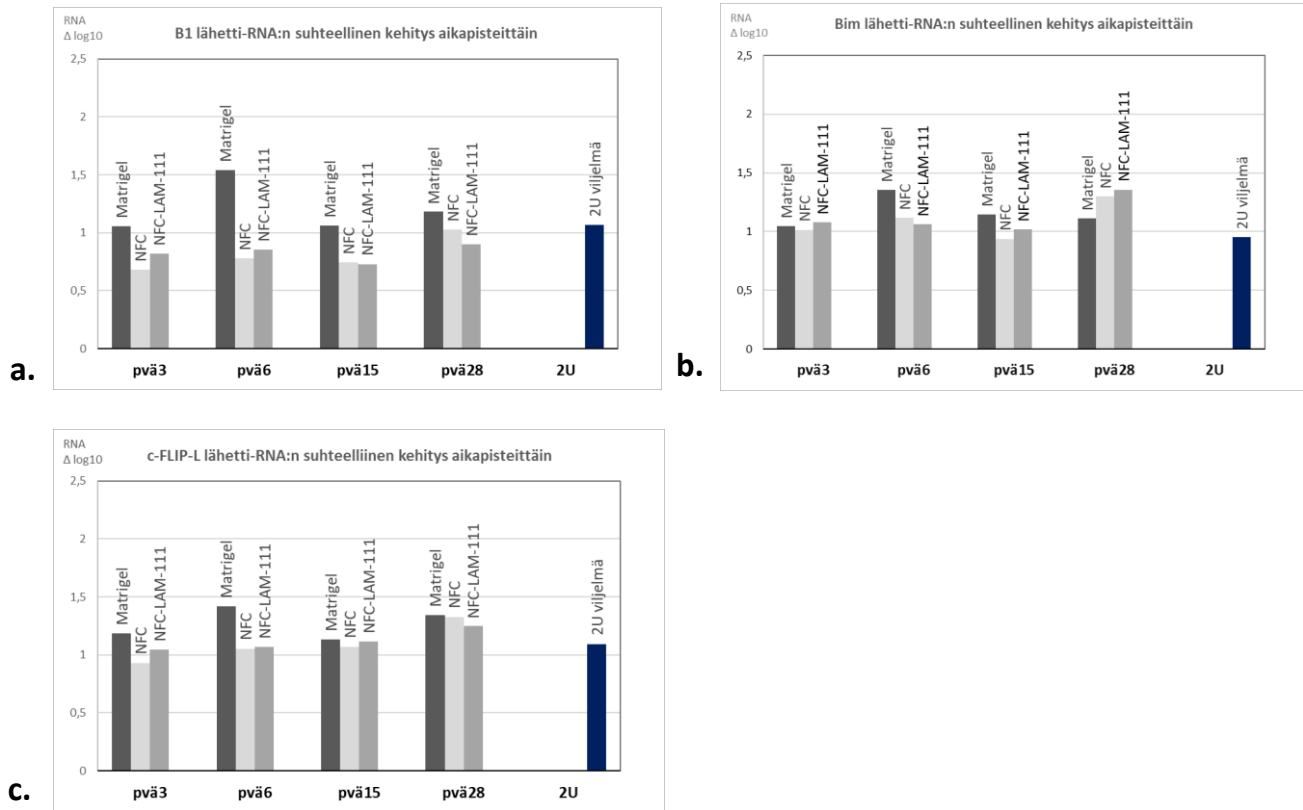
Bim(EL) alukkeiden tehokkuus oli 96,99%, ja qPCR ajon lopussa havaittu alukkeiden erkanemislämpötila oli yhtenäinen (LIITE 1). Matrigel™ -kontrolliviljelmissä Bim(EL):in ilmentäminen oli huipussaan päivänä 6, jolloin mRNA:n suhteellinen kasvu oli noin 18 % verraten muiden aikapisteiden määriin, jotka pysyttelivät samalla ilmentämisen tasolla muiden aikapisteiden aikana. Natiivi-NFC viljelmien Bim(EL):in ilmentyminen oli vähäisesti koholla päivänä 6, ja nousi vähintään 16 % ja enintään 38,5 % päivänä 28 verraten muihin aikapisteisiin. NFC-LAM-111 -olosuhteen Bim(EL):in ilmentyminen kohosi noin 25-33% päivänä 28 verraten muiden aikapisteiden ilmentymisten tasoon, yltäen Matrigel™ viljelmien päivän kuusi ilmentymisen tasolle (kuvaaja 1: c).

c-FLIP-L

C-FLIP-L:n alukkeiden tehokkuus oli 85,43%, ja ajon tuotteiden erkanemislämpötilan kuvaaja viittasi mahdollisesti vähäiseen määrään kontaminanttia 2U, -sekä päivän 28 Matrigel™ -näytteissä. Matrigel™ -viljelmissä mRNA:n ilmentämisen taso kohosi 20-25 % päivänä 6, ja uudelleen 13-18 % lähes samalle tasolle päivänä 28. Natiivi-NFC viljelmien c-FLIP-L:n ilmentäminen nousi vähäisesti päivinä 6 ja 15, ja kohosi 26-43 % päivänä 28. NFC-LAM-111 -viljelmissä c-FLIP-L:n ilmentäminen nousi vähäisesti päivänä 15, ja päivänä 28 kohosi 11-19 % verraten muihin aikapisteisiin (kuvaaja 1: d).

2U -verrokkiolosuhde

2U -viljelyolosuhteen geenien ilmentyminen näytti verraten melko korkeaa $\beta 1$ -integriini mRNA:n tuoton tasoa, hyvin vähäistä säätelyä c-FLIP-L:n ilmentämisen tasossa, ja kaikista olosuhteista alhaisinta Bim(EL) mRNA:n tuoton tasoa (kuvaaja 1).



Kuvaaja 1. MCF 10A 3U -viljelmien (Matrigel™, NFC, NFC-LAM-111) lähetti-RNA:n tuoton vaihtelut aikapisteittäin päivinä 3, 6, 15 ja 28. Kuvaajat on normalisoitu olosuhteiden $\beta 2$ -mikroglobuliini -referenssigeenin mRNA:n ilmentämisen tasoihin verraten (LIITE3). $\beta 1$ -integriinin tuotto kasvoi jyrkimmin Matrigel™:ssä päivänä 6, ja molemmissa NFC -olosuhteissa päivänä 28. 2U -olosuhteessa havaittiin molempia NFC -olosuhteita korkeampi $\beta 1$ -integriinin mRNA:n tuoton taso (a). Apoptoosin käynnistävän Bim -proteiinin mRNA:n korkein tuoton kasvu havaittiin Matrigel™ -viljelmissä päivänä 6, ja molemmissa NFC -olosuhteissa päivänä 28. 2U -olosuhteessa havaittiin alhaisin Bim-mRNA:n tuotto (b). Apoptoosilta suojelevan c-FLIP-L:n tuotto oli korkeimmillaan Matrigel™:ssä päivänä 6, ja kohosi uudelleen päivänä 28. Molemmissa NFC -olosuhteissa c-FLIP-L:n mRNA:n ilmentäminen nousi eniten päivänä 28. 2U -olosuhteen c-FLIP-L:n mRNA:n tuottotaso pysyi lähes samana kuin kaikkien muiden olosuhteiden c-FLIP-L:n taso päivänä 15 (c).

7. Tulosten tarkastelu

7.1 NFC -olosuhteiden sferoidien kehitys oli mahdollisesti Matrigel™:n sferoideja hitaampaa

LAM -111:n lisäys NFC:hen tuotti valomikroskoopilla havaittavia muutoksia sferoidien muotoon ja pinnan morfologiaan, sekä histologisen HE-analyysin mukaan myöskin jossain määrin edisti alveolin muodostumista. HE -halkaisuleikkeissä molemmissa NFC -olosuhteissa oli havaittavissa monikystisiä ja epäsäännöllisiä alveolirakenteita, joita havaittiin valomikroskoopilla hyvin vähäisessä määrin myös Matrigel™ -olosuhteessa (LIITE 4). LAM-111 -lisä NFC kasvualustassa onnistui tuottamaan myös yksittäisen alveolin sisältämiä sferoideja.

PCR -analyysissä oli havaittavissa, että nopeasti luumenin muodostavien Matrigel™ -viljelmien päivän kuusi aikapisteessä oli johdonmukaisesti polarisoitumisessa mikroputkien uudelleenjärjestäytymistä koordinoivan $\beta 1$ -integriinin mRNA:n nousua, luumenin apoptoottisesta tyhjentymisestä vastaavan Bim(EL)-mRNA:n nousua, sekä samanaikaisesti apoptoosilta suojaavan c-FLIP-L:n mRNA:n nousu, viitaten hallittuun rakenteiden muokkaukseen (*Akhtar ja Streuli 2013, Reginato ym. 2003, Yerbey ym. 2011*). Sen sijaan vastaavan kaltainen ilmentämisprofiili tapahtui molemmissa NFC -olosuhdeviljelmissä vasta päivänä 28. Huomattavimmat ilmentämisen tasojen eroavaisuudet Matrigel™:n ja molempien NFC -olosuhteiden välillä havaittiin $\beta 1$ -integriinin mRNA:n määrissä, joissa molempien NFC -olosuhteiden $\beta 1$:n määrät pysyivät päivän 28 erityshuippuja lukuun ottamatta jopa 2U -verrokiviljelmää alemmalla tasolla.

Epiteelirakenteiden luumenin muodostuminen on Bim(EL) proteiinin säätlemää ja riippuvaista kavitatiota edeltävästä sisäsolukon polarisaation katoamisesta, johon puolestaan liittyy $\beta 1$ -integriinin toiminta polarisoituneen rakenteen vakauttajana (*Mailleux ym 2007*). Kuten aiemmin kuvattu, luumeni muodostuu polarisoituneiden epiteelipintojen väliin jäävien -ja tyvikalvokontaktista irtautuneiden solujen apoptoottisella kuolemalla Bim(EL) -proteiinin edistämänä. Tyvikalvon negatiivista säätelyä edustavan $\beta 1$ -integriinin solukontaktin poistumisen on ehdotettu sekä nostavan Bim(EL):in transkriptiota, että myöskin mahdollistavan tuotetun Bim(EL) -proteiinin aktivoinnin sitä inhiboivan EGFR -

Erk:in toiminnan poistuessa (*Reginato ym. 2003*). Hallitussa apoptoosissa keskeisen c-FLIP-L:n ilmentyminen rajautuu säilytettäviin solurakenteisiin, jossa FLIP-L kilpailee kaspasi 8:n sitoutumiskohdasta apoptoosiprosessin käynnistävässä proteiinikompleksissa solukalvolla (*Yerbes ym. 2011*).

Syy luumenin muodostukseen liittyvän solusäätelyn viivästykselle molemmissa NFC -olosuhteissa saattaa johtua kasvualustan kontaktipinnan puutteista. *In vitro* -kokeet ihmisen rintarauhasen solulinjoilla viittaavat tyvikalvoproteiini-köyhän kasvualustan viivästyttävän polarisoitumisprosessia, ja mahdollisesti kannustavan soluja tyvikalvokontaktien puutteita kompensoimaan rakenteiden-, tyvikalvon proteiinien -ja erilaistuneiden solutyypin tuottoon (*Gaiko-Shcherbak ym. 2015, Inman ja Bissell 2010, Streuli ja Bissell 1990*). On mahdollista, että NFC:stä puuttuvien tyvikalvoproteiinien vuoksi viljelmillä on tarve ylimääräiselle tehtävänjaoille luminaali- ja myoepiteelisolutyypeiksi, mikä on hidastanut luumenin syntyä viljelyn loppuvaiheisiin. On epätodennäköistä, että havaittu Bim(EL) -proteiinin ilmentymisen nousu NFC -viljelmissä johtuisi puutteellisen tyvikalvokontaktin laukaisemasta apoptoosista, sillä ilmiö tapahtuu verraten myöhään, on rinnakkainen samanaikaisesti nousevan apoptoosilta suojaavan c-FLIP-L:n kanssa, ja noudattaa myös $\beta 1$ -integriinin ilmentämisen nousun osalta normaalisti polarisoituvien Matrigel™ -viljelmien ilmentämisprofiilia. Tässä kokeessa havaittujen NFC-LAM-111 -sferoidien kanssa samankaltaista morfologiaa on myös tuotettu kaupallisessa käytössä olevalla Cultrex-3U -alustalla, joka koostuu ainoastaan LAM-111:stä (R&D Systems, USA). Esimerkkitutkimuksen Cultrexissa tuotettujen MCF 10A:n kontrollisferoidien morfologia muistutti tässä kokeessa NFC-LAM-111:ssä havaittua yhden luumenin sferoidien morfologiaa, ja Cultrexissa kasvatettujen H-RAS:ia yli-ilmentävien sferoidien morfologia tämän kokeen monikystisiä sferoideja (*Hoenerhoff ym. 2009*).

Luumenien muodostus oli hidastuneen säätelyn lisäksi myös epätäydellistä, ja syyt havaituille epä säännöllisille rakenteille saattavat johtua NFC -viljelmien mahdollisesta hapen puutteesta solumassan lisääntyessä, taikka puutteellisesta hapen diffuusiosta, joita ei tietääksemme ole arvioitu kyseisellä materiaalilla. Happivajeen edistämän tekijä-1:n (HIF-1) on havaittu nostavan polarisoitumisprosessiin kuuluvan EGFR – Mek/Erk signalointia Bim(EL):in toimintaa estävälle tasolle, sekä lisäksi edistävän rintarauhasen luminaalisen solukon kasvua ajavan AREG:in ilmentymistä (*Mukhopadhyay ym. 2013, Whelan ym. 2010*). Monikystisiä ja epätäydellisesti tyhjentyviä luumeneita on havaittu myös

Bim(EL):in toimintaa edeltävän, polarisaatioprosessissa keskeisten integriini- $\beta 1$ ^(-/-) ja integriiniki-naasi (ILK) ^(-/-) -tekijöiden poistogeenikokeissa (Akhtar ja Streuli 2013, Reginato ym. 2003). Hiirten Bim(EL)^{-/-} poistogeenikokeissa on havaittu tiehyiden ja TEB:in rakenteissa väliaikaista, okasolukkoa muistuttavaa luminaalisen tilan täyttymistä. Esimerkkitutkimuksessa lumenista hitaasti poistuva so-lumassa ilmensi hajoavalle DNA:lle tyypillisiä TUNEL -positiivisia sekä myöskin kaspasi -negatii-visia soluja, viitaten kaspaseista riippumattomaan solukuolemaan. Esimerkkitutkimuksen analyysien mukaan rakenteiden havaittiin tyhjenevän myöhemmin happiradikaalien aiheuttamalla stressillä (Mailleux ym 2007). On kuitenkin huomioitava, että happivajeen tuottaman solukuoleman viivästymi-sen on havaittu korjautuvan itsestään 72 tunnin jälkeen, joten todennäköisesti happivaje ei yksinään riittäisi tuottamaan havaittuja lumenin morfologian häiriöitä Bim:in toimintaan (Whelan ym. 2010).

7.2 Matrigel™ mallintaa erilaista kasvunicheä kuin NFC -olosuhteet

Immunovärjäysten tuloksissa ilmeni selkeästi, ettei yhtenevä LAM-111 -määrä kokeellisen NFC-LAM-111:n ja Matrigel™ -olosuhteen välillä riittänyt tuottamaan samanlaisia kasvu ympäristöjä, ja että NFC-LAM-111 muistutti ilmentämiensä proteiinien perusteella edelleen enemmän muokkaama-tonta natiivi-NFC kasvu ympäristöä. Olennaisimmat eroavaisuudet NFC -viljelmien välillä olivat ha-vaittavissa e-kadheriinin, vimentiinin sekä $\beta 4$ -integriinin rakenteellisessa sijoittumisessa, ja NFC -olosuhteiden ja Matrigel™ -näytteiden välillä lisäksi myös proteiinien ilmentämisen ajoituksessa.

Viljelypäivänä 15 natiivi-NFC:ssä kasvaneet näytteet ilmensivät e-kadheriinia, vimentiiniä sekä $\beta 4$ -integriiniä sferoidien sisäosissa, joista muutoksia päivään 28 mennessä tapahtui ainoastaan $\beta 4$ -integriinin levittäytymisessä laajemmalti sferoidin solujen väleihin.

Päivänä 15 NFC-LAM-111 -sferoidit sen sijaan ilmensivät kaikkia em. proteiineja pääosin sferoidin uloimmassa solukerroksessa: e-kadheriinia luminaalisella puolella ytimen solumassan ja uloimman solukerroksen välissä, vimentiiniä kehämäisesti satunnaisissa ulkopinnan soluissa, ja $\beta 4$ -integriiniä ulkopinnan solujen välissä. Päivään 28 mennessä vimentiinin ilmentäminen loppui, ja e-kadheriinia havaittiin ilmentyvän eri sferoideissa sekä uloimmassa että myöskin sisemmässä solukerroksessa. $\beta 4$ -integriiniä oli edelleen havaittavissa solujen väleissä määrittelemättömässä sijainnissa.

Päivän 15 Matrigel™ -viljelmissä ei ollut havaittavissa e-kadheriinin ilmentämistä, mikä saattaa mu-
kailla aikaisempien tutkimusten havaintoja e-kadheriinin ilmentämisen dramaattisesta laskusta päi-
vien 8 ja 10 välillä LAM-111 -geelissä (*Benton ym. 2009*). Mielenkiintoista kuitenkin oli päivien 3 ja
15 puuttuvat, sekä päivänä 28 havaittavissa oleva -ja NFC -olosuhteisiin verraten heikko e-kadherii-
nin ilmentyminen sferoidin pinnan soluissa. NFC -olosuhteiden päivän 28 voimakas e-kadheriinin
ilmentäminen verraten Matrigel™:n heikkoon e-kadheriinin ilmentämiseen saattavat heijastaa luon-
nollisessa rintarauhasessa havaittuja eroavaisuuksia e-kadheriinipitoisuuksissa tiehyiden epiteeliso-
lujen ja maitorauhasten epiteelisolujen välillä (*Hsiao ym. 2011*). Solu-solu liitosten-, sekä solukalvon
kokeman mekaanisen stressin on havaittu välittyvän aktiini-myosiiniketjujen kautta e-kadheriinille,
joka välittää ärsykkeen alfa- ja β -kateniinin avulla tumaan säätelyvasteiksi (*Borghi ym. 2012*). Sen
lisäksi että NFC -alustat kelluvat vapaasti viljelykaivossa, kokivat NFC --viljelmät myös satunnaista
sentrifugointia elatusnesteiden vaihdon yhteydessä, mikä on entuudestaan saattanut lisätä NFC viljel-
mien vastaanottamaa mekaanista stressiä.

Matrigel™ -viljelmien soluissa havaittiin vimentiiniä sferoidin reunan solukossa vielä päivänä kolme
(kuva 3: e), mutta ei myöhemmissä aikapisteissä päivinä 15 tai 28. Vimentiinin on havaittu hiiren
in vivo -kudoksissa edustavan esiin kasvavan tiehyen tulevien myoepiteelisolujen välimuotoista fila-
menttityyppiä, joka mahdollistaa solujen migraation, avustaa luumenin muodostumisessa, sekä yllät-
tään, liittyy myös basaalisien epiteelisolutyyppien uudistumiskykyyn ja solusäätelyyn (*Peuhu ym. 2017*).
Vimentiinin asteittainen poistuminen viljelmistä laskevassa LAM-111:n -pitoisuuden järjestyksessä,
jääden päivänä 28 ainoastaan natiivi-NFC:n sferoideihin, tukisi teoriaa LAM-111:n epiteelirakenteita
vakauttavasta vaikutuksesta (*Benton 2009*). On mahdollista, että Matrigel™:n voimakkaasti polari-
soiva ympäristö hiljentää vimentiinin ilmentymistä säätelämällä negatiivisesti vimentiiniä ilmentä-
vien solutyyppien erilaistumista, tai jo polarisoituneen ja tehtävänsä erikoistuneen solutyyppien vi-
mentiinin ilmentämistä.

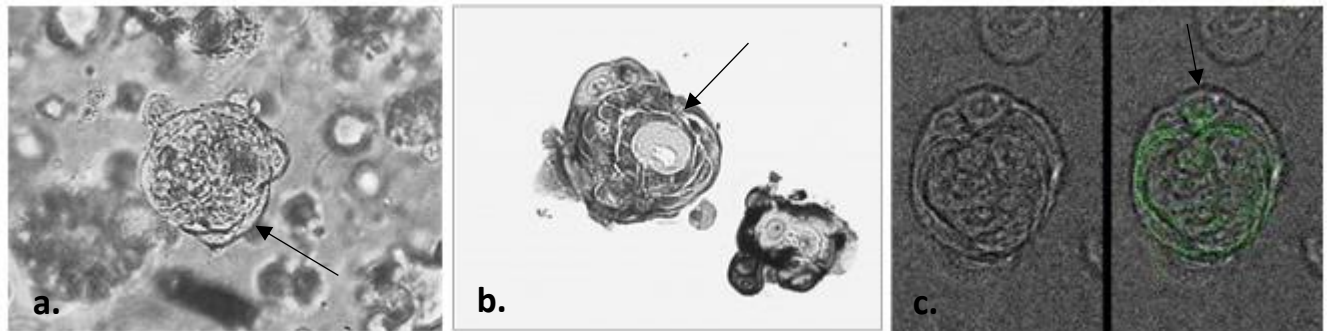
$\beta 4$ -integriiniä oli havaittavissa Matrigel™ -olosuhteissa päivinä kolme ja 15, muttei enää päivänä 28,
mikä oli odottamatonta. Luonnollisessa rintarauhasessa myoepiteelisolujen $\alpha 6 \beta 4$ -integriinidimeeri
ankkuroi, linkkeriproteiinin välittämänä, solun hemidesmosomirakenteet solunulkoisen pohjakuoren
322 ja 111 -laminiineihin, tarjoten epiteelille rakenteellista tukea. Hemidesmosomirakenteen ulko-
puoliset $\alpha 6 \beta 4$ -sidokset sen sijaan edistävät haarautuvan kasvun migrointia kasvualustaan eritetyn

laminiini-332:n avulla (*Nisticò ym. 2014, Stahl ym. 1997*). MCF 10A -viljelmissä $\alpha\beta 4$ -dimeerin on havaittu ilmentyvän Matrigel™:n kontaktipintaan, painottaen Matrigelin sisältämää LAM-111:tä, johon rinnan epiteelisolut itse erittävät LAM-332:ta kiinnittymistä varten (*Stahl ym. 1997*). Mikroskooppisten havaintojen -sekä materiaalin valmistajan tuotetiedotteen perusteella on mahdollista, että pitkässä viljelyssä Matrigel™ -alustan rakenne alkaa hajota, mikä saattaisi vaikuttaa viljelmien morfologiaan ja kontaktipinnan välittämään solusäätelyyn.

DAPI -värjäysten onnistuminen päivän kolme Matrigel™ -näytteiden värjäyksissä (kuva 3) ja epäonnistuminen kaikissa päivän 15 ja 28 näytteissä, sekä selittämätön $\beta 4$ -integriinin puuttuminen päivän 28 Matrigel™ -näytteistä, vaativat suhtautumaan immunovärjäysten tuloksiin varauksella. On mahdollista, että näytteiden PFA -säilönnässä käytetty 20 minuutin inkubaatioaika ei ole ollut riittävä, ja näytteissä käynnissä olleet apoptoottiset ja autolyttiset prosessit ovat jatkaneet toimintaansa viikon jääkaappisäilönnän aikana hajottaen näytteistä ne DNA:n osiot, jota PFA ei ole säilönyt (*Hoffman ym. 2015*). On myös mahdollista, että värjäyksessä käytetty kokeellinen lasilevy metodi vaatii lisäoptimointia, ja että näytteet ovat päässeet esimerkiksi kuivumaan pipetointivaiheiden välillä. Kaikissa tapauksissa immunovärjäysten tuloksiin tulee suhtautua varauksella.

7.3 NFC:ssä kasvaneissa sferoideissa havaittiin ylimääräisiä epiteelikerroksia

Tutkimuksen odottamattomana löydöksenä oli molemmissa NFC-olosuhteissa kasvaneissa sferoideissa havaittu kotelomainen solukerros pyöreän ydinosan ympärillä, joka puuttui kokonaan Matrigel™ -viljelmistä. Havainto toistui valomikroskoopilla otetuissa kuvissa (kuva 10: a), histologisissa HE-halkaisuleikkeissä (kuva 10: b), sekä immunovärjäyksissä (kuva 10: c). Solukerros muistuttaa luonnollisen rintakudoksen tiehyiden ja maitorauhasen ympärille sijoittuvaa myoepiteelisolujen kerrosta.



Kuva 10. Ylimääräinen epiteelinen solukerros havaittiin korostuneena erityisesti NFC-LAM-111 -olosuhteissa kasvaneissa sferoideissa päivän 28 valomikroskooppitarkastelussa (a) ja HE-halkileikkauksissa (b), sekä päivän 15 immunovärjäyksissä ilmentyvää e-kadheriinia ympäröivänä solukerroksena (c).

Aiemmin julkaistut havainnot MCF 10A -linjan ilmentämistä kanta- ja esiastesolu -proteiinityypeistä saattaisivat tukea teoriaa (Qu *ym.* 2015). Ihmisen fibrokystisestä rintakudoksesta eristettyjen normaaliin MCF 10A:n ja HMT-3522-S1 (S1) -solulinjojen vertailukokeissa on myös havaittu suuria eroavaisuuksia linjojen vaatimuksissa elatusnesteiden kasvutekijöiden suhteen, sekä kyvyssä erilaistua eri rakenteiksi. Verraten S1 -linjaan, MCF 10A tuottaa suurempia sferoideja ja on huomattavasti vaativampi elatusnesteensä koostumuksen suhteen (Inman ja Bissell 2010). Luonnollisen rintakudoksen solutyypeistä myös aikuisen kantasoluja sisältävän tiehytperäisten solukon on havaittu muodostavan rauhasepiteelisolukkoa suurempia sferoideja rinnan näytepalojen *in vitro* -tutkimuksissa (Villadsen *ym.* 2007).

MCF 10A:n edustaman solutyypin vastaavuutta *in vivo* -kudoksien soluihin on toisaalta myös kyseenalaistettu Matrigel™:ssä, suspensiossa ja kollageeni-I -viljelmissä havaittujen päällekkäisten luminaali-myoepiteelimarkkerien vuoksi, jotka viittaavat puutteelliseen erilaistumisprosessiin (Qu *ym.* 2015, Dhimolea *ym.* 2010). Lisäksi myoepiteelisoluille tyypillisen p63 -proteiinin on havaittu puuttuvan MCF 10A -viljelmistä Matrigel™:ssä (Qu *ym.* 2015).

In vitro -tutkimuksissa on esitetty, ettei Matrigel™ tue myoepiteelisolujen erilaistumista johtuen Matrigel™:n sisältämästä myoepiteelisestä LAM-111:stä, tai Matrigel™:n mahdollisesti sisältämistä, solujen kaikkikykyisyyttä tukevista tuntemattomista kasvutekijöistä. Esimerkkitutkimuksessa pri-

määrisestä rintarauhasesta eristettyjen luminaali- ja myoepiteelisolujen havaittiin muodostavan polarisoituneita ja kahdeksi kerrokseksi järjestäytyneitä rintarauhasen tiehyitä ja haaroittuvia rakenteita ainoastaan kollageeni-I - 3U -yhteisviljelmissä, ja tuottavan ainoastaan onttoja sferoideja Matrigel™ 3U -yhteisviljelmissä. Solutyyppien keskinäinen järjestäytyminen kahdeksi kerrokseksi onnistui ainoastaan kollageeni-I:ssä, ja sen sijaan tuotti Matrigel™:ssä luminaali- ja myoepiteelisoluille tyypillisten epitooppien K8:n ja p-kadheriini:n päällekkäistä ilmentymistä samassa solukossa (*Carter ym. 2017*). P63 -transkriptiotekijän on lisäksi havaittu puuttuvan maitorauhasen myoepiteelisoluista, mutta ilmentyvän tiehyiden myoepiteelisoluissa, mikä saattaa selittää aikaisemmin havaittua p63:n ilmentymisen puuttumista Matrigel™:ssä kasvatetussa MCF 10A -linjassa, mikäli Matrigel™ edustaa ainoastaan maitorauhaselle tyypillistä tyvikalvon 3U -mallia (*Hsiao ym. 2011, Qu ym. 2015*).

Lisäksi on huomioitava, että yleisesti MCF 10A:n elatusnesteessä käytetyn EGF:n on havaittu tukevan sekä luminaalisten että myoepiteelisten solutyyppien erilaistumista rinnan kantasoluista (*Mukhopadhyay ym. 2013*). Luonnollisen kudoksen kehityksessä epidermaalisen kasvutekijän reseptorin sitoutumiskohdasta kilpailevat AREG ja EGF tuottavat koordinoitusti eriaistaisen vasteen sitomansa reseptorin välityksellä, sekundäärisessä kehityksessä ylliedustetun AREG.in tuottaessa erityisesti luminaalisten solujen erilaistumissuntaa aiheuttavaa säätelyä (*Mukhopadhyay ym. 2013, Gjorevski ja Nelson 2011*).

8. Johtopäätökset

Tutkimus tarjoaa tapauskohtaisen esimerkin useista keskenään vuorovaikuttavista tekijöistä 3U-*in vitro* -mallinnuksessa. Keskeisiä tekijöitä ovat valitun solumallin kyky edustaa aiottua solutyyppiä, sekä 3U -alustan suunnittelussa huomioitavat linjan mahdolliset sopeutumisprosessit ympäristöönsä, joiden ymmärtäminen on tulosten tulkinnan kannalta olennaisen tärkeitä. Elatusnesteen koostumus ansaitsee myös ylimääräistä huomiota etenkin erilaistumaan kykenevien linjojen käytössä (*Mukhopadhyay ym. 2013, Pasic ym. 2011, Kanninen ym. 2016, Inman ja Bissell 2010*).

Tämän tutkimuksen pyrkimys tuottaa onttoja ja polarisoituneita sferoideja NFC-3U -viljelmässä lisäämällä alustaan LAM-111 -tyyppiä toteutui ainoastaan osittain ja vaatii lisätutkimusta. On mahdollista, että tutkimuksessa käytetty LAM-111:n määrä ei riittänyt tuottamaan morfologialtaan samankaltaista kasvua Matrigel™:ssä kasvatettujen sferoidien kanssa, ja että lisäksi Matrigel™:n sisältämä kollageeni-IV mahdollisesti tehosti LAM-111 -signalointia Matrigel™:ssä (*Benton ja George 2005, Gaiko-Shcherbak ym. 2015*). On myös mahdollista, että Matrigel™:n sisältämät kasvutekijät, joista esimerkiksi FGF:llä, EGF:llä ja TGFβ:llä on keskeiset roolit rintarauhasen kehityksessä, selittävät olosuhteen tuottamien sferoidien maitorauhasten lohkoja muistuttavan homogeenisen morfologian (*BD Biosciences*).

Valomikroskoopilla ja HE-värjäyksillä havaittu monikystisyys johtui todennäköisesti NFC-3U -ympäristön tuottamista polarisoitumisen häiriöistä, joiden korjautumisen varmentaminen joko hidastuneella morfogeneesillä, taikka vaihtoehtoisella happiradikaali-välitteisellä tyhjentymisellä olisi vaahtunut pidemmän viljelyajan (*Mailleux ym 2007*). Tulosten arvioinnissa on myös huomioitava, että MCF 10A on fibrokystinen linja, jonka lahjoittaneen potilaan rintakudoksessa havaittiin tiehyiden sisäistä liikakasvua ja apokriinista solumuutosta, jotka saattavat tuottaa luontaisesti monikystisiä sferoideja ja muita epäsäännöllisiä rakenteita vapaata kasvua sallivassa 3U -ympäristössä, kuten NFC (*ATCC; Soule ym. 1990*).

MCF 10A:n määrittely solumallina

MCF 10A kykenee joustavuuteen 3U-morfologian muodostuksessa, ja heijastaa kasvu ympäristönsä tarjoamaa *in vitro* -nicheä. On mahdollista, että Matrigel™:ssä kasvaneet solut tunnistavat itsensä yksinomaisesti luminaalisiksi epiteelisoluiksi, ja että kelluvassa, sekä kaikista eläinperäisistä rakenteista tyhjistä NFC:ssä kasvaneet solut joutuvat läpikäymään ylimääräisen erilaistumisvaiheen kahdeksi solutyypiksi tyvikalvon puuttuessa, mikä johtaisi polarisoitumisen ja kavitaation viivästymiseen. Tämän lisäksi on mahdollista, että muodostaessaan sferoidin epiteelirakenteita solut tulkitsevat sijaintinsa rintaepiteelin ”rauhaspuussa” kasvualustan jäykkyyden ja saatavilla olevien tyvikalvoproteiinien kautta. Näin ollen korkeaa e-kadheriinipitoisuutta ilmentävät NFC -viljelmät saattavat mallintaa rauhastiehyiden epiteelin rakenteita, joissa tyvikalvoproteiinien määrä on vähäisempi, ja joissa on havaittu maitorauhasten lohkoja korkeampaa e-kadheriinin ilmentämistä (*Hsiao ym. 2011, Hu*

ym. 2017). Teoriaa saattaisi myös tukea analyyseissa havaitut $\beta 1$ -integriinin ilmentämisen eroavaisuudet NFC ja Matrigel™ -olosuhteiden välillä, joissa $\beta 1$ -integriinin ilmentäminen säilyi verraten korkeammalla tasolla Matrigel™ -olosuhteessa. Rinnan normaalissa homeostasiassa $\beta 1$ -integriinin välittämä säätely painottuu maitorauhasen alveolin sisärakenteiden muodostukseen, maidon tuottamiseen, sekä luminaalisten epiteelisolujen erilaistumisen säätelyyn ja apoptoosilta suojaamiseen tertiäärivaiheen organogeneesissä (*Nisticò ym. 2014*).

Edellä kuvattu morfologian kehitys saattaisi merkitä MCF 10A:n edustavan ympäristönsä ominaisuuksia heijastavaa rinnan kantasolutyyppiä, ja NFC:n edustavan rintakudoksen sekundääriseen kasvuvaiheen mekaanista ympäristöä ilman kollageeni-I:n biologista kontaktia, tai kaavoittavia TGF β -gradientteja. Tämän tutkimuksen analyysit eivät kuitenkaan riitä vahvistamaan näitä olettamuksia, ja aihe vaatii jatkotutkimuksia vertailevilla 3U -alustakokeilla. Tarkempaa määrittelyä tarvitaan myös MCF 10A -linjassa havaittujen kantasolun kaltaisten ominaisuuksien mahdollisesta mutaatioista johtuvan alkuperän poissulkemisessa, sekä myöskin MCF 10A:n fibrokystisyyden vaikutuksen arvioinnissa 3U -rakenteiden muodostuksessa (*Qu ym. 2015, Soule ym 1990*).

NFC 3U -alustana

Nanokuituselluloosa on osoittautunut aikaisemmissa tutkimuksissa jäykkyysarvoiltaan muokattavaksi *in vitro* -bioalustaksi, ja soveltuvan ihmisen alkioperäisten kantasolujen sekä useimpien syöpälinjojen viljelyyn. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan ajatella, että materiaali soveltuu muokattavaksi myös kasvu ympäristönsä suhteen vaativammille solulinjoille lisäämällä tarvittavia kasvunichen tekijöitä alustan sekoitusvaiheessa, sekä mahdollisesti myös soveltuvan erilaistumaan kykenevien -ja ympäristönsä puutteita kompensoimaan kykenevien solutyyppien 3U -kasvualustaksi. On mahdollista, että pyrittäessä aikaansaamaan toiminnallisten rakenteiden muodostuksen lisäksi myös tehtävänjakoa edellyttävää solutyyppien toiminnallista erilaistumista, täytyy 3U -viljelyalustan tarjota polarisoitumista ohjaavien tyvikalvokontaktien lisäksi myös kudostyyppillinen mekaaninen säätely-ympäristö (*Alcaraz ym. 2008, Dhimolea ym. 2010*)

Vaikka rintarauhasen kehitysvaiheiden tutkimusta on viety eteenpäin merkittävästi hiirimalleilla, havaitut eroavaisuudet lajien kehityksen säätelyssä saattavat tuottaa virheellisiä tulkintoja esimerkiksi

signalointireittiä kohdentavan lääkkeen tutkimuksissa (*Pasic ym. 2011*). Mikäli teoria NFC:n kelluvuuden mahdollistamasta toiminnallisesta erilaistumisesta saa vahvistusta jatkotutkimuksissa, NFC saattaa osoittautua hyödylliseksi 3U -materiaaliksi kehitysbiologian ja syövän tutkimuksissa. NFC – MCF 10A 3U-mallin tarjoamia etuja syöpätutkimuksen mallinnuksessa ovat myös mahdollinen happivajaa kasvu ympäristö NFC -geelin alimmissa kerroksissa. Happivajaan ympäristön on havaittu kuuluvan säännönmukaisesti syövän kudostyypistöön, ja vaikuttavan olennaisesti kehittymisen säätelyprosesseihin, kuten apoptoosin välttäminen ja tyvikalvon säätelystä vapautuminen (*Whelan ym. 2010*). Lisäksi, useimpien aggressiivisten rintasyöpien on havaittu olevan tiehyen epiteelistä alkupeirää (*Carter ym. 2017, Whelan ym. 2010*). Mikäli MCF 10A -linja arvioidaan tulevaisuuden tutkimuksissa tiehyen normaaliksi kantasolutyypiksi, soveltuisi linja mallintamaan syövän kehityksen eri vaihteita 3U -ympäristön ominaisuuksien vaihtelun tai linjaan aiheutettujen mutaatioiden mukaisesti, sekä lisäksi myös mahdollisesti tuottamiensa myoepiteelisolujen avulla, joiden on arvioitu vaikuttavan olennaisesti syövän kehitykseen (*Hsiao ym. 2011*).

8.1. Jatkotutkimus

Matrigel™:n mahdollisesti edustamaa solujen erilaistumista puutteellisesti tukevaa 3U -ympäristöä, sekä MCF 10A:n kykyä edustaa olemassa olevaa, erilaistumiskykyistä rinnan solutyyppiä, voidaan arvioida solusiirtokokeilla, joissa epiteelisoluista puhdistettua ihmisen *ex vivo* -rintakudosta hyödynnetään kasvatusalustana. Tutkimuksen verrokkilinjana voitaisiin lisäksi käyttää primääristä, tiehytperäiseksi määriteltyä kantasolulinjaa (*Pasic ym. 2011, Sternlicht 2005, Villadsen ym. 2007*). Lisäksi, MCF 10A -linjan genomia tulisi arvioida viljelysopeumien ja mutaatioiden läsnäolon poissulkemiseksi (*Qu ym. 2015*).

NFC:n kykyä sitoa tyvikalvon proteiineja vakaan tyvikalvoympäristön mahdollistamiseksi tulisi arvioida esimerkiksi vasta-aine analyysillä, sillä keinotekoisien 3U -alustojen testauksissa lisättyjen tekijöiden alustaan sitoutumisen on arvioitu vaikuttavan syntyvien solu-kasvualustasidosten laatuun (*Alcaraz ym. 2008, Chaudhuri ym. 2014, Inman ja Bissell 2010, Gaiko-Shcherbak ym. 2015*).

NFC:n kykyä toimia 3U -alustana voisi arvioida jatkotutkimuksissa määrittelemällä kokeissa havaittuja MCF 10A:n morfologisia rakenteita. Havaittuja NFC:n tuottamia häiriöitä luumenin muodostuksessa voidaan arvioida esimerkkitutkimuksessa havaittujen, väliaikaisesti luumenia täyttävien kasvannaisten ilmentämällä keratiini-10 ja fillagrin -vasta-aineilla (*Mailleux ym. 2007*). Lisäksi NFC-3U -ympäristön mahdollista vähähappisuutta voidaan määrittellä HIF-1 α -mRNA:n PCR -analyysillä, ja lisäksi viljelmissä havaitun laaja-alaisen apoptoosin alkuperästä tulisi poissulkea mahdollinen ylikuormituksesta johtuva sisäsolukalvoston stressin läsnäolo (*Whelan ym. 2010*).

NFC:ssä mahdollisesti tapahtuvaa solutyypin erilaistumisen vaiheita voidaan arvioida LAM-111:n sijoittumisella. TEB:in kehitysvaihetta noudattavissa kärkisolukon kantasoluissa LAM-111 sijoittuu solujen sisälle, mutta erilaistuneissa myoepiteelisoluissa solukalvon apikaaliselle puolelle (*Srinivasan ym. 2003*). Erilaistuneiden myoepiteelien ja luminaalisten epiteelisolujen läsnäoloa tulisi arvioida alfa-SMA ja K14, sekä K18 ja MUC1 -vasta-aineväryyksillä (*Qu ym. 2015*). Lisäksi NFC -viljelymallin edustamaa ”sijaintia” rintarauhaspuussa voidaan määrittellä tiehyiden soluille tyypillisten luminaalisen keratiini K6a:n ja myoepiteelisen K17:n, sekä lohkorauhasten luminaalisen BCA-225:n ja myoepiteelisen WT1:n vasta-aine analyysillä (*Villadsen ym. 2007*). Mahdollinen maitoproteiinien β -kaseiinin tai transferrinin tuotto tulisi myös tarkistaa immunoväryyksillä tai mRNA -analyysillä (*Qu ym. 2015, Dhimolea ym. 2010*).

Parannusehdotuksia tämän tutkimuksen koeasetelmaan

Mikäli tämän kokeen koeasettelua halutaan toistaa, olisi suositeltavaa tehdä vertailevaa tutkimusta kellovilla Cultrex, Matrigel™, NFC ja NFC-LAM-111 3U -viljelmillä, ja lisäksi Matrigel™ -olosuhteen vertautuvuutta voisi parantaa esimerkiksi vaihtamalla 2,5U -malli 3U -geelimalliin. NFC:n poistoon käytettyä entsyymiä tulisi seisoittaa yön yli kaikissa olosuhteissa vertailun parantamiseksi, ja lisäksi kaikkien olosuhteiden tulisi kokea sentrifugointikäsittely elatusnesteeseen vaihtamisen yhteydessä. Näytteiden säilöminen immunoväryyksiä ja histologisia analyysejä varten tulisi jatkossa tehdä pidentäen PFA -seisotuksella huoneenlämmössä, sekä pyrkiä välttämään näytteiden säilöntää.

9. Kiitokset

Haluan kiittää perhettäni tuesta tutkimusprojektin aikana, sekä antaa tunnustusta ohjaajalleni Raili Koivuniemelle kannustavasta yhteistyöstä. Erityiset kiitokset Yliopistonlehtori Pekka Heinolle, sekä kiitokset työn valvojana toimineelle Perinnöllisyystieteiden Professori Juha Partaselle. Viimeiseksi, kiitokset valvojalleni Farmaseuttisten Biotieteiden Professori Marjo Yliperttulalle, joka mahdollisti tämän tutkimusprojektin erinomaisilla soluviljelyyn erikoistuneilla laboratoriotiloillaan, asiantuntevalla henkilöstöllään, sekä innovatiivisella kehitystutkimuksen yhteistyöllään biomateriaalien toimijoiden parissa.

Tämä työ on UPM Kymmene:n rahoittama. Haluan lopuksi kiittää UPM Kymmene:ä inspiroivasta, tehokkaasta ja ammattimaisesta yhteistyöstä GrowDex®:n tuotekehityksen tutkimusten parissa.

10. Lähdeaineisto

Akhtar N., Streuli C. H. (2013). An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nature Cell Biology*, 15: 17–27.

Alcaraz J., Xu R., Mori H., Nelson C.M., Mroue R., Spencer V.A., Brownfield D., Radisky D.C., Bustamante C., Bissell M.J. (2008). Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO Journal*, 27: 2829–2838.

Benton G., George J. (2005). Defining 3-D Culture for Investigating Breast Cancer Progression. *BioScience Technology; Application note*, 1:50-52.

Benton G., Crooke E., George, J. (2009). Laminin-1 induces E-cadherin expression in 3-dimensional cultured breast cancer cells by inhibiting DNA methyltransferase 1 and reversing promoter methylation status. *The FASEB Journal*, 23:3884-3895.

Bhattacharya M., Malinen M. M., Lauren P., Lou Y-R., Kuisma S. W., Kanninen L., Lille M., Corlu A., GuGuen-Guillouzo C., Ikkala O., Laukkanen A., Urtti, A., Yliperttula, M. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *Journal of Controlled Release*, 164:291-298.

Borghi N., Sorokina M., Shcherbakova O.G., Weis W.I., Pruitt B.L., Nelson W.J., Dunn A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *PNAS*, 109:12568-12573.

Brownfield D. G., Venugopalan G., Lo A., Mori H., Tanner K. (2013). Patterned Collagen Fibers Orient Branching Mammary Epithelium through Distinct Signaling Modules. *Current Biology*, 23:703-709.

Butcher D. T., Alliston T., Weaver V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 9:108–122.

Carter E.P., Gopsill J.A., Gomm J.J., Jones J.L., Grose R.P. (2017). A 3D in vitro model of the human breast duct: a method to unravel myoepithelial-luminal interactions in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 19:50.

Chaudhuri O., Koshy S. T., Branco da Cunha C., Shin J-W., Verbeke C. S., Allison K. H., Mooney D. J. (2014). Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nature Materials*, 13:970-978.

Debnath J., Mills K.R., Collins N.L., Reginato M. J., Muthuswamy S.K., Brugge J.S. (2003). The Role of Apoptosis in Creating and Maintaining Luminal Space within Normal and Oncogene-Expressing Mammary Acini. *Cell*, 111:29-40.

Dhimolea E., Maffini M. V., Soto A. M., Sonnenschein C. (2010). The role of collagen reorganization on mammary epithelial morphogenesis in a 3U culture model. *Biomaterials*, 31:3622-3630.

Dimmeler S., Ding S., Rando T. A., Trounson A. (2014). Translational strategies and challenges in regenerative medicine. *Nature Medicine*, 20:814-21.

Fabregat I. (2009). Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 15:513–520.

Gaiko-Shcherbak A., Fabris G., Dreissen G., Merkel R., Hoffmann B., Noetzel E. (2015). The Acinar Cage: Basement Membranes Determine Molecule Exchange and Mechanical Stability of Human Breast Cell Acini. *PLoS ONE*, 10: e0145174.

Gajewska M., Zielniok K., Motyl T. (2013). Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? *InTechOpen*, 20:443-464.

Gjorevski N., Nelson C. M. (2011). Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12:581-93.

Glukhova M. A., Streuli C. H. (2013). How integrins control breast biology. *Current Opinion in Cell Biology*, 25:633-641.

Gudjonsson T., Rønnov-Jessen L., Villadsen R., Rank F., Bissell M.J., Petersen O.W. (2001). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science*, 115:39-50.

Hay M., Thomas D.W., Craighead J.L., Economides C., Rosenthal J. (2014). Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature Biotechnology*, 32:40-51.

Hinck L., Silberstein G. B. (2005). Key stages in mammary gland development: The mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Research*, 7: 245–251.



Hoenerhoff M.J., Chu I., Barkan D., Liu Z-y., Datta S., Dimri G.P., Green J.E. (2009). BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene*, 28:3022–3032.

Hoffman E. A., Frey B. L., Smith L. M., Auble D. T. (2015). Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290:26404-26411.

Hsiao Y-H., Tsai H-D., Chou M-C., Man Y-g. (2011). The Myoepithelial Cell Layer May Serve As a Potential Trigger Factor for Different Outcomes of Stage-Matched Invasive Lobular and Ductal Breast Cancers. *International Journal of Biological Sciences*, 7:147-153.

Hu G., Li L., Xu W. (2017). Extracellular matrix in mammary gland development and breast cancer progression. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1:36-39.

Härmä V., Virtanen J., Mäkelä R., Happonen A., Mpindi J-P., Knuuttila M., Kohonen P., Lötjönen J., Kallioniemi O., Nees M. (2010). A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. *PLoS ONE*, 5: e10431.

Inman J.L., Bissell M.J. (2010). Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *Journal of Biology*, 9:2.

Kanninen L. K., Harjumäki R., Peltoniemi P., Bogacheva M.S., Salmi T., Porola P., Niklander J., Smutný T., Urttia A., Yliperttula M. L., Lou Y-R. (2016). Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 103:86-100.

Lance A., Yang C.C., Swamydas M., Dean D., Deitch S., Burg K.J., Dréau D. (2016). Increased extracellular matrix density decreases MCF 10A breast cell acinus formation in 3U culture conditions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10:71-80.

Laurén P., Lou Y-R., Raki M., Urtti A., Bergström K., Yliperttula M. (2014). Technetium-99m-labeled nanofibrillar cellulose hydrogel for in vivo drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65:79-88.

Le Beyec J., Xu R., Lee S-Y., Nelson C. M., Rizki A., Alcaraz J., Bissell M. J. (2007). Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 313:3066-3075.

Lou Y-R., Kanninen L., Kuisma T., Niklander J., Noon L. A., Burks D., Urtti A., Yliperttula, M. (2014). The Use of Nanofibrillar Cellulose Hydrogel As a Flexible Three-Dimensional Model to Culture Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 23:380-392.

Macias H., Hinck L. (2012). Mammary Gland Development. *Wiley Interdisciplinary Reviews, Developmental Biology*, 1:533–557.

Mailleux A. A., Overholtzer M., Schmelzle T., Bouillet P., Strasser A., Brugge J. S. (2007). BIM Regulates Apoptosis During Mammary Ductal Morphogenesis and its Absence Reveals Alternative Cell Death Mechanisms. *Developmental Cell*, 12:221–234.

Malinen M. M., Kanninen L.K., Corlu A., Isoniemi H. M., Lou Y. R., Yliperttula M. L., Urtti A.O. (2014). Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. *Biomaterials*, 35:5110-21.

Miller A.V., Hics M.A., Nakajima W., Richardson A.C., Windle J.J., Harada H. (2013). Paclitaxel induced apoptosis is BAK dependent but BAX and BIM independent in breast tumor. *PLoS ONE*, 8: e60685.

Miller D.H., Jin D. X., Sokol E. S., Cabrera J. R., Superville D. A., Gorelov R. A., Kuperwasser C., Gupta P. B. (2018). BCL11B Drives Human Mammary Stem Cell Self-Renewal In Vitro by Inhibiting Basal Differentiation. *Stem Cell Reports*, 10:1131-1145.

Mukhopadhyay C., Zhao X., Maroni D., Band V., Naramura M. (2013). Distinct Effects of EGFR Ligands on Human Mammary Epithelial Cell Differentiation. *PLoS ONE*, 8: e75907.

Muschler J., Streuli CH. (2010). Cell–Matrix Interactions in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2: a003202.

Nedvetsky P. I., Kwon S.-H., Debnath J., & Mostov K. E. (2012). Cyclic AMP regulates formation of mammary epithelial acini in vitro. *Molecular Biology of the Cell*, 23:2973–2981.

Nguyen-Ngoc K.V., Cheung K.J., Brenot A., Shamir E.R., Gray R.S., Hines W.C., Yaswen P., Werb Z., Ewald A.J. (2012). ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *PNAS USA*, 109: E2595–E2604.

Niranjan B., Buluwela L., Yant J., Perusinghe N., Atherton A., Phippard D., Dale T., Gusterson B., Kamalati T. (1995). HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development*, 121:2897-2908.



Nisticò P., Di Modugno F., Spada S., Bissell M. J. (2014). $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Research*, 16:459.

Pasic L., Eisinger-Mathason K. T. S., Velayudhan B. T., Moskaluk C. A., Brenin D. R., Macara I. G., Lannigan D.A. (2011). Sustained activation of the HER1–ERK1/2–RSK signaling pathway controls myoepithelial cell fate in human mammary tissue. *Genes & Development*, 25: 1641-1653.

Pearson J. F., Hughes S., Chambers K., Lang S. H. (2009). Polarised fluid movement, and not cell death creates luminal spaces in adult prostate epithelium. *Cell Death and Differentiation*, 16:475–482.

Perel P., Roberts I., Sena E., Wheble P., Briscoe C., Sandercock P., Macleod M., Mignini L. E., Jayaram P., Khan, K. S. (2007). Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*, 334:197.

Peuhu E., Virtakoivu R., Mai A., Warri A., Ivaska J. (2017). Epithelial vimentin plays a functional role in mammary gland development. *Development*, 144:4103-4113.

Qu Y., Han B., Yu Y., Yao W., Bose S., Karlan B. Y., Giuliano A. E., Cui X. (2015). Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 10: e0131285.

Reginato M.J., Mills K.R., Paulus J.K., Lynch D.K., Sgroi D.C., Debnath J., Muthuswamy S.K., Brugge J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature Cell Biology*, 5:733-40.

Rinner B., Gandolfi G., Meditz K., Frisch M.T., Wagner K., Ciarrocchi A., Torricelli F., Koivuniemi R., Niklander J., Liegl-Atzwanger B., Lohberger B., Heitzer E., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N., Zweght D., Zalaudek I. (2017). MUG-Mel2, a novel highly pigmented and well characterized NRAS mutated human melanoma cell line. *Nature Scientific Reports*, 7:2098.

Shehata M., Andrew Teschendorff A., Gemma Sharp G., Nikola Novcic N., I Alasdair Russell A. I., Avril S., Prater M., Eirew P., Caldas C., Watson C. J., Stingl J. (2012). Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Research*, 14: R134.

Spencer V.A., Costes S., Inman J.L., Xu R., Chen J., Hendzel M.J., Bissell M.J. (2011). Depletion of nuclear actin is a key mediator of quiescence in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 124:123-132.

Srinivasan K., Strickland P., Valdes A., Shin G. C., Hinck L. (2003). Netrin-1/Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells during Mammary Gland Morphogenesis. *Developmental Cell*, 4: 371-382.



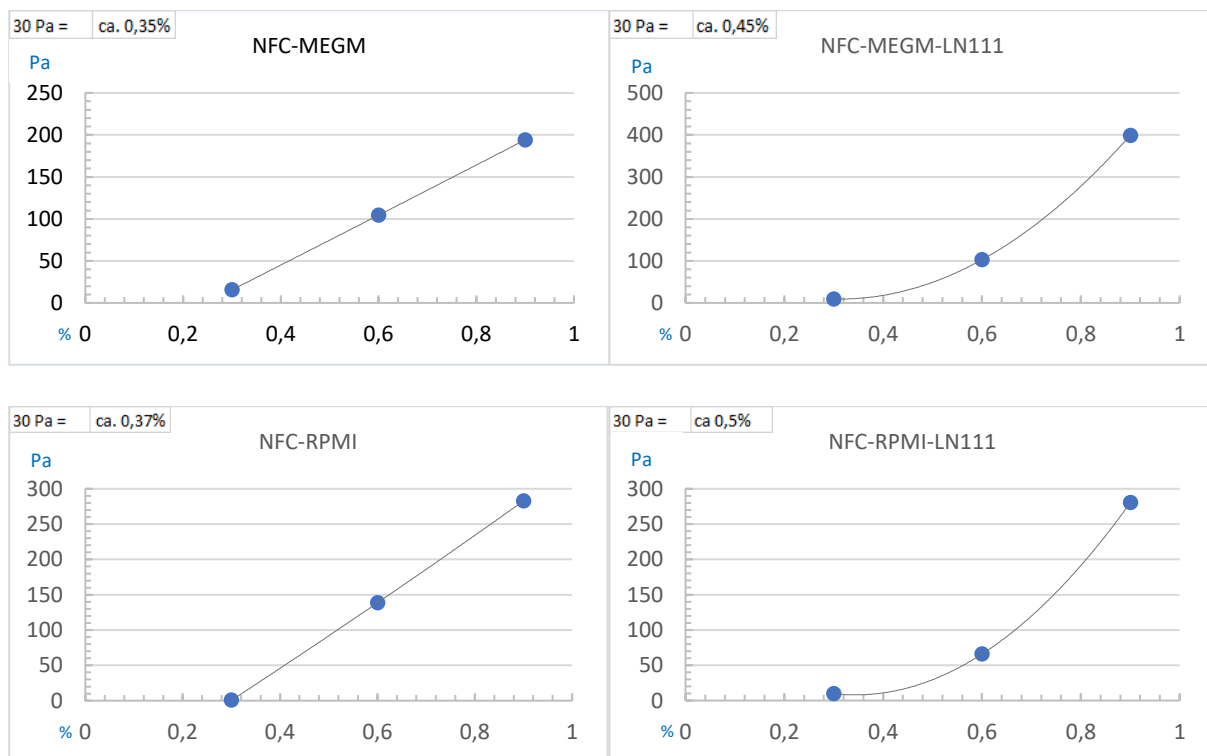
- Stahl S., Weitzman S., Jones J. C. R.** (1997). The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 110:55-63.
- Sternlicht M. D.** (2005). Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*, 8:201.
- Stingl J., Eaves C.J., Zandieh I., Emerman J. T.** (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*, 67:93-109.
- Streuli C. H., Bissell M. J.** (1990). Expression of Extracellular Matrix Is Regulated by Substratum. *The Journal of Cell Biology*, 110:1405-1415.
- Soule H.D., Maloney T.M., Wolman S.R, Peterson W.D. Jr., Brenz R., McGrath C. M., Russo J., Pauley R. J., Jones R. F., Brooks S. C.** (1990). Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *American Association for Cancer Research*, 50:6075-6086.
- Taylor M. A., Amin J. D., Kirschmann D. A., Schiemann W. P.** (2011). Lysyl Oxidase Contributes to Mechanotransduction-Mediated Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling in Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 13:406-418,
- Uzer G., Rubin C. T., Rubin J.** (2016). Cell Mechanosensitivity Is Enabled by the LINC Nuclear Complex. *Current Molecular Biology Reports*, 2:36-47.
- Villadsen R., Fridriksdottir A. J., Rønnov-Jessen L., Gudjonsson T., Rank F., LaBarge M. A., Bissell M. J., Petersen O. W.** (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *Journal of Cell Biology*, 177: 87-101.
- Whelan K. A., Caldwell S. A., Shahriari K. S., Jackson S. R., Franchetti L. D., Johannes G. J., & Reginato M. J.** (2010). Hypoxia Suppression of Bim and Bmf Blocks Anoikis and Luminal Clearing during Mammary Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 21:3829–3837.
- Yang Y., Wang K., Gu X., Leong K.W.** (2017). Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering*, 3:36-54.
- Yerbes R., Palacios C., Reginato M.J., López-Rivasa A.** (2011). Cellular FLIPL plays a survival role and regulates morphogenesis in breast epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813:168-178.

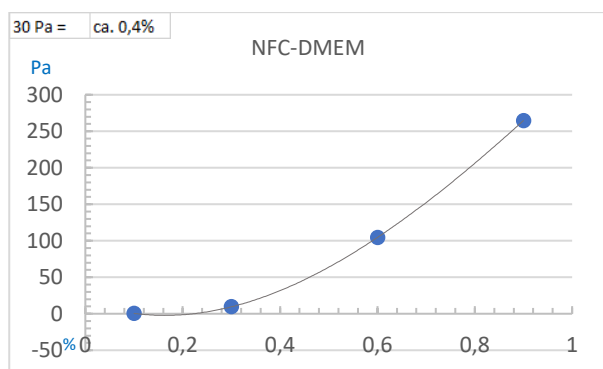
11. LIITTEET

LIITE 1

NFC seosten jäykkyyden määrittäminen

NFC-seos -alustan jäykkyyden riippuvuutta eri elastusnestetyyppien, LAM-111 -lisä- ja NFC:n lopputitoisuuden suhteen arvioitiin tilaustyönä UPM:n laboratoriossa Controlled stress rotational rheometer AR-G2 (TA Instruments, UK) -laitteistolla.





Työssä päätettiin käyttää 0,35% NFC – DMEM -viljelyalustaa tarkoituksena liikkumavaran mahdollistaminen tiheväälle soluviljelmälle, sekä sentrifugoinnin mahdolliselle vaikutukselle. Perustuen tässä esitettyihin optimointiviljelmien materiaalimitauksiin, NFC-LAM-111 – DMEM -seoksessa NFC:n ja lisätyn laminiinin suhteeksi arvioitiin 0,25ul:n NFC -määrän korotus jokaista lisättyä LAM-111 ul kohden, jossa laminiinia lisättiin lopulliseen 115ng/ml pitoisuuteen, ja NFC:n määrän lisäys tehtiin 0,35% natiivi NFC-DMEM seoksen NFC määrään. Lisätyn NFC:n ja laminiinin määrä vähennettiin seoksen laimentamisessa käytetystä elatusnesteestä, pitäen lopullisen kokonaistilavuuden samana. Tässä kokeessa LAM-111 -pitoisuutena pidettiin 115ug/ml, ja NFC-LAM-111 -seoksen NFC pitoisuudeksi tuli 0,39%.

LIITE 2

Eristetyn RNA:n laadun ja pitoisuuden arviointi NanoDrop ND - 1000 -laitteistolla.

RNA-
40

RNA

nro	sample	Abs	A-260	A-280	260/280	260/230	ng/ul
1	2D	15,070	33,550	16,368	2,05	2,23	1342
1 (1:10)	2D	1,607	3,868	2,015	1,92	2,41	154,7
2	d3-M	1,894	3,714	1,815	2,05	1,96	148,5
3	d6-M	4,552	9,373	4,580	2,05	2,60	374,9
4	d28-M	3,068	3,378	1,633	2,07	1,10	135,1
5	d6-1	0,695	1,237	0,638	1,94	1,78	49,5
6	d28-1	0,693	1,290	0,660	1,95	1,86	51,6
7	d3-2	0,447	0,962	0,484	1,99	2,15	38,47
8	d6-2	0,698	1,258	0,645	1,95	1,80	50,33
9	d28-2	0,567	0,987	0,489	2,02	1,74	39,48
10	d3-1	0,490	0,925	0,497	1,86	1,89	37
11	d15-1	0,660	1,184	0,632	1,87	1,79	47,4
12	d15-2	0,598	1,037	0,531	1,95	1,73	41,5
13	d15-M	0,795	1,679	0,834	2,01	2,11	67,2
14	d6-1	0,279	0,513	0,245	2,1	1,84	20,5
15	d28-1	0,529	1,251	0,635	1,97	2,36	50,0
16	d3-2	0,427	0,975	0,506	1,92	2,28	39,0
17	d6-2	0,582	1,30	0,659	1,97	2,23	52,0
18	d28-2	0,510	0,842	0,419	2,01	1,65	33,7

Taulukko 1. 3U -viljelyolosuhteiden RNA:n pitoisuuksia arvioiva 260/280 (nukleiinihappo/proteiini) absorbtiosuhdetaulukko, jossa arvo 1,8 viittaa DNA:n tai proteiini-kontaminanttien läsnäoloon, ja arvo 2 edustaa puhdasta RNA:ta. Näytteiden nimeämisessä *d* edustaa päivää, ja näyte "1" natiivi NFC:tä, näyte "2" NFC-LAM-111 olosuhdetta ja näyte "M" Matrigel™ -olosuhdetta. "2D" -näyte edustaa 2U -viljeltyä MCF 10A -näytettä. Spektrofotometrin mittausprofiilina pidettiin RNA-40 -asetuksia.

LIITE 3

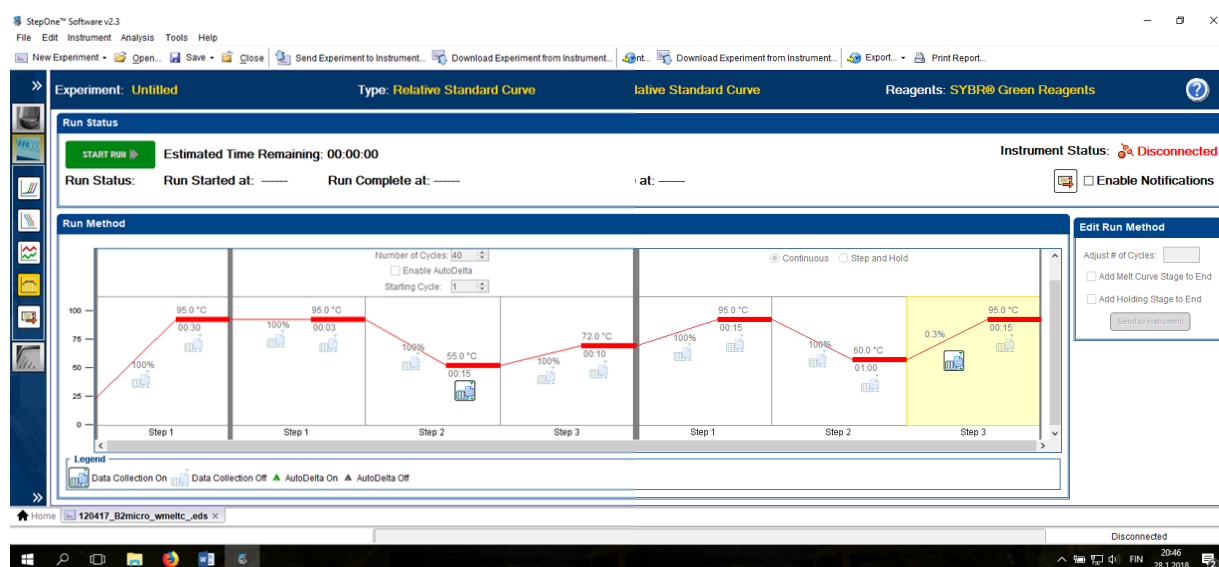
PCR -alukkeiden suunnittelu

Valmistettujen alukkeiden laadun tarkistus tehtiin Premier Biosoft ilmaisohjelmalla: <http://www.premierbiosoft.com/kPCR/index.html>, minkä jälkeen vähiten ylimääräisiä sidosrakenteita muodostaneet alukkeet tilattiin Thermo Fisheriltä. Ajojen raakadatassa havaittava ”APO” -näyte edustaa lahjoitukseen saatua paklitakselikäsiteltyä MUG-Mel2 -melanomalinjaa, jonka tarkoituksena oli toimia apoptoosiprosessin solusignaaloinnissa mm. BIM -verrokkina. Olosuhde jätettiin pois tuloksista ei-relevanttina johtuen alan tutkimuksissa havaituista eroavaisuuksista apoptoosin signalointireiteissä solutyypin välillä, joista esimerkkeinä ihmisen rinnan SK-BR-3, T47D ja MDA-MB-468 -syöpälinjoissa paklitakselin on havaittu käynnistävän apoptoosiprosessin BAK-, eikä BIM -välitteisesti (Miller *ym.* 2013). Näin ollen MUG-Mel2 ei välttämättä vertautuisi normaalin MCF10A:n käyttäytymiseen paklitakselialtistuksessa.

β 2-mikroglobuliini (referenssigeeni)

1. Alukkeet vastaanotettu lahjoituksena Raili Koivuniemeltä:

FW: CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG
RW: GCTTACATGTCTCGATCCCACT



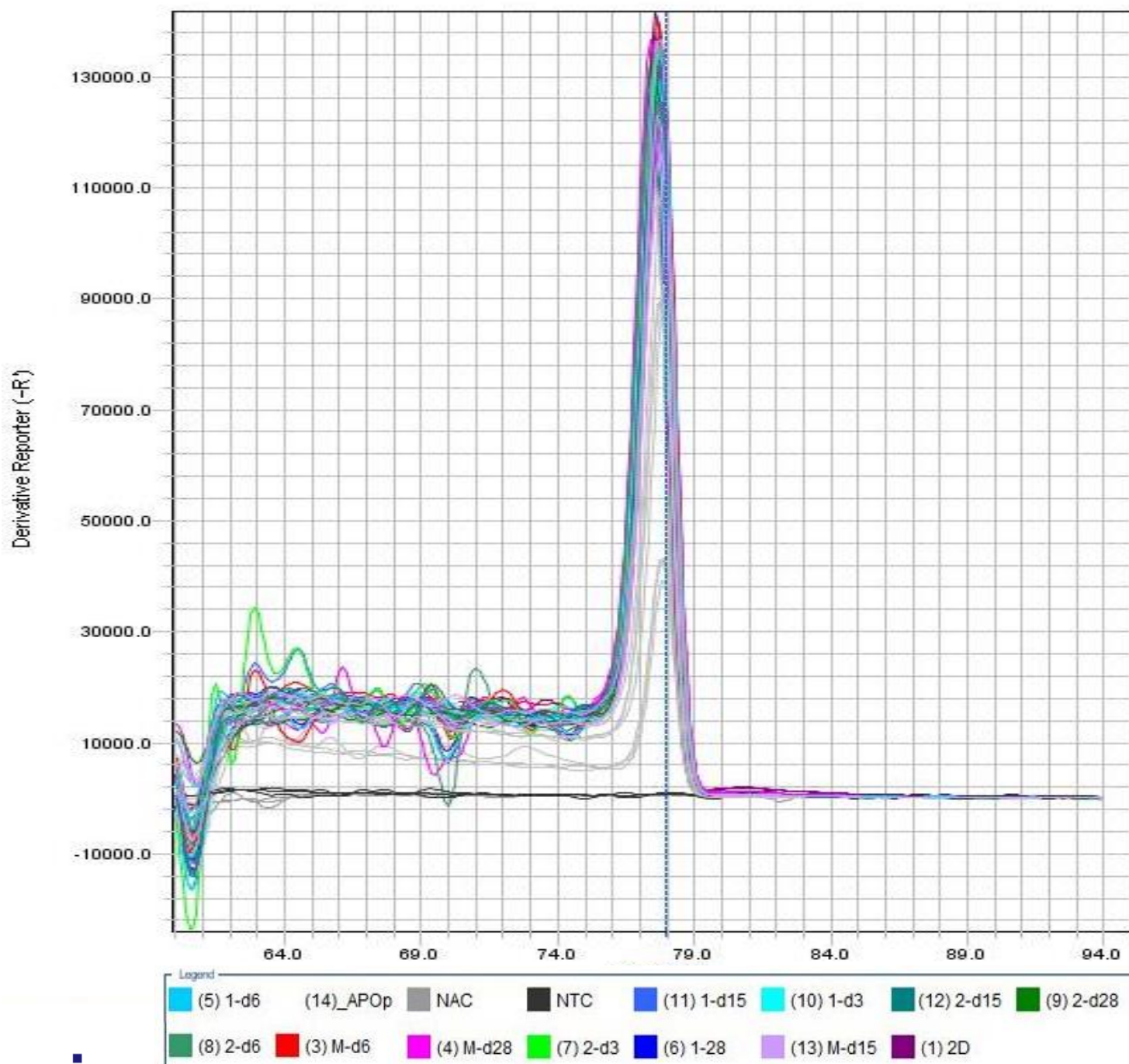
Ajon asetukset

Step 1. +95C / 30s

Step 1. +95C / 3s / Step 2. +55C / 15s (datan keruu) / Step 3. +72C / 10s (40x sykliä)

Step 1. +95C / 15s / Step 2. +60C / 60s / Step 3. +95C / 15s (datan keruu)


Melt Curve



sekä NFC – soluväliaine proteiini -yhdistelmäympäristössä”

Johanna Niklander

Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto



76

>NM_001204110.1 Homo sapiens BCL2 like 11 (BCL2L11), transcript variant 15, mRNA
>NM_001204111.1 Homo sapiens BCL2 like 11 (BCL2L11), transcript variant 16, mRNA
>NM_001204112.1 Homo sapiens BCL2 like 11 (BCL2L11), transcript variant 17, mRNA
>NM_001204113.1 Homo sapiens BCL2 like 11 (BCL2L11), transcript variant 18, mRNA

1. Näytteistä toivotaan havaittavan: Bim(EL)-EL, NM_138621.4 variantti 1 (pisin varianttiversio)
2. Yhtenevästi rajautunut ja alukkeiden suunnitteluun valittu sekvenssialue saatu asetuksilla: ClustalW strict; kaikki Bim(EL) varianttisekvenssit, joiden linjatuista alueista mukaan 138621.4 (Bim(EL)-EL)

```
AGATCCTCCCTGCTGTCTCGATCCTCCAGTGGGTATTTCTCTTTTGACACAGACAGGAGCCCAGCACCCATG
AGTTGTGACAAATCAACACAAACCCCAAGTCCTCCTTGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCAGTGCAATGGC
TTCCATGAGGCAGGCTGAACCTGCAGATATGCGCCCAGAGATATGGATCGCCCAAGAGTTGCGGGCGTATTG
GAGACGAGTTTAACGCTTACTATGCAAGGAG
```

3. Työhön valitut alukkeet aikaansaatu kohdan 2 sekvenssillä ajettuna NCBI:n Primer-BLAST ohjelman tarkennetuilla ajoasetuksilla: pcr tuotekoko max. 200bp, BLAST odotettu e-arvo 100, BLAST sanakoko 10. Sekvenssiehdotuksista vain variantti 1 hakuun.

4. NCBI Primer-BLAST ohjelman ehdottamien alukevaihtoehtoista valittu alukepari:

(Bim(EL)-EL variants 1,X13,X12,X2.X1.13,2,4,): pari 4

FW: TTTGACACAGACAGGAGCCC
RW: CCAATACGCCGCAACTCTTG

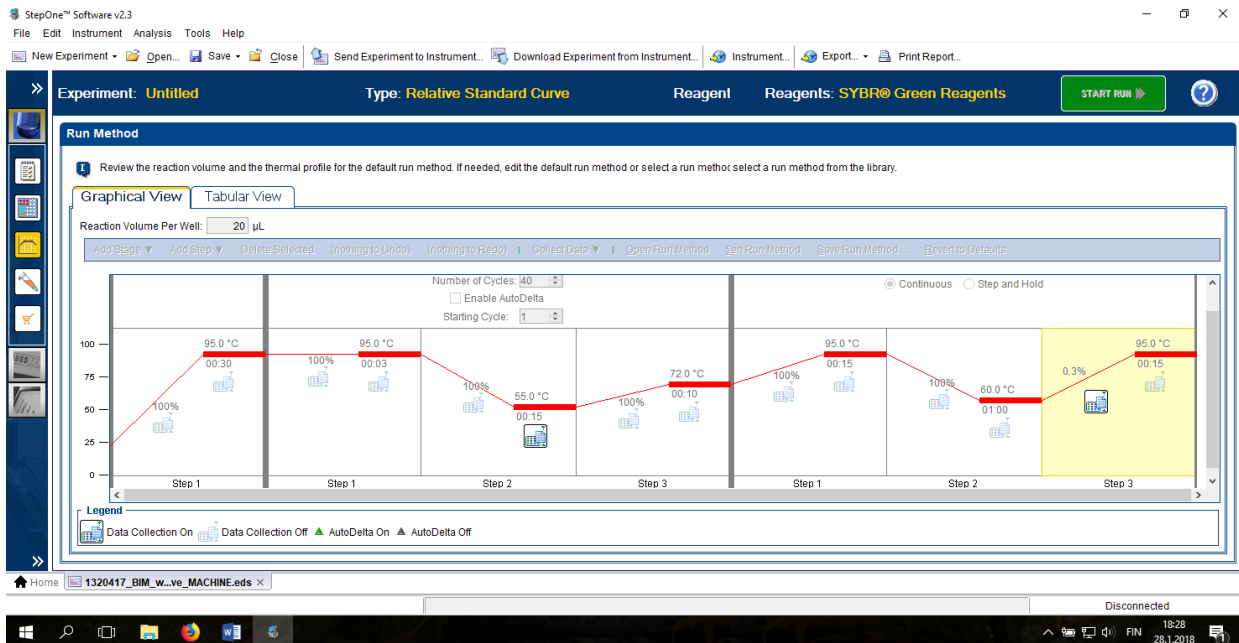
5. Näytteiden ajo StepOne Plus laitteistolla:

”MCF 10A:n polarisaatio ja alveolin muodostus nanokuituselluloosageelissä (NFC)
sekä NFC – soluväliaine proteiini -yhdistelmäympäristössä”

Pro gradu -tutkielma 2018

Johanna Niklander

Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto



Ajon asetukset

1. +95C / 30s

1. +95C / 3s **40x sykliä**

2. +55C / 15s (datan keruu)

3. +72C / 10s

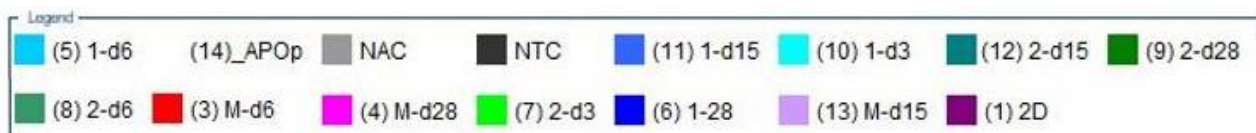
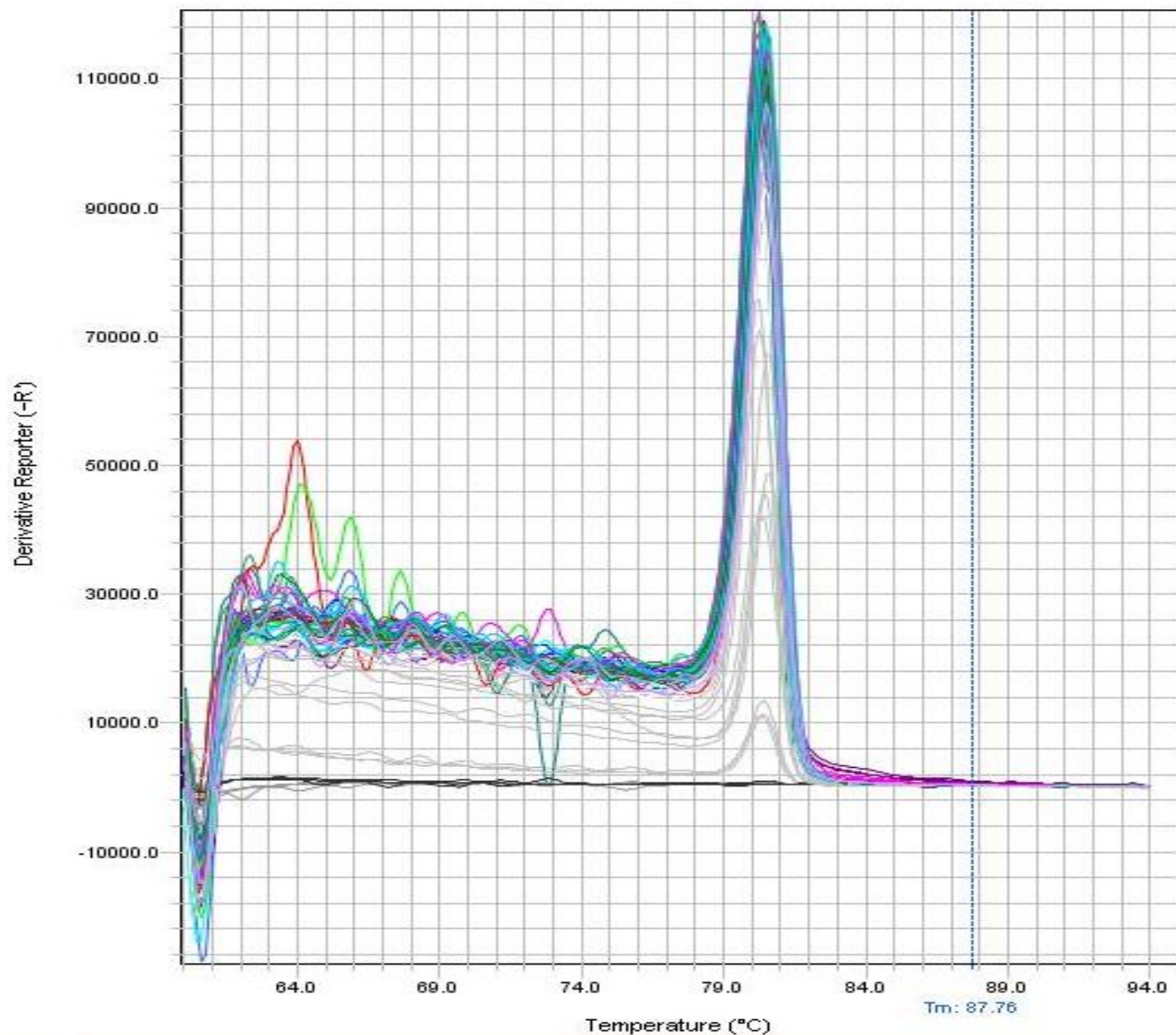
1. +95C / 15s

2. +60C / 60s

3. +95C / 15s (datan keruu)

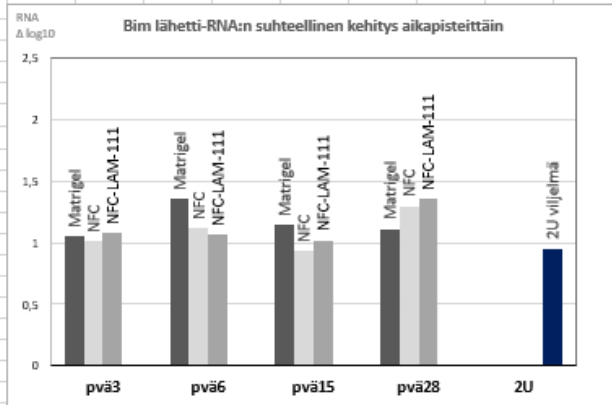
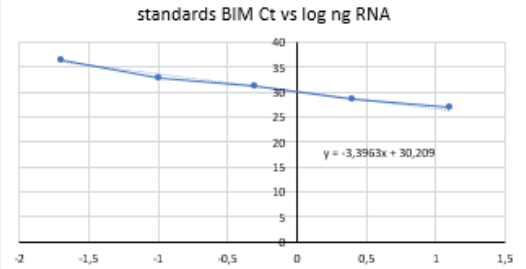


Melt Curve



Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1																						
2																						
3		96,99%	BIM			Matrigel pvä3																
4																						
5			Ct aver.		ng cDNA	log10		Ct Mean	d3	d6	d15	d28	2D									
6													25,615									
7			26,89		12,5	1,097		Matrigel	26,892	27,478	25,982	25,723										
8			28,54		2,5	0,398		NFC	25,617	24,825	26,186	25,16										
9			31,19		0,5	-0,3		NFC-LAM-111	24,733	24,984	25,624	24,854										
10			32,99		0,1	-1																
11			36,54		0,02	-1,7																
12								B2 mikroglobuliinikontrollin														
13								suhteellinen														
14								RNA log10														
15																						
16																						
17																						
18																						
19																						
20																						
21																						
22																						
23																						
24																						
25																						
26																						
27																						
28																						
29																						
30																						
31																						
32																						
33																						
34																						
35																						
36																						
37																						
38																						
39																						



β1-integriini (ITGB1)

(variantit 1A,1E,1D),

1. Näytteistä havaitaan kaikki variantit
2. Yhtenevästi rajautunut ja alukkeiden suunnitteluun valittu sekvenssialue saatu asetuksilla: ClustalW strict; kaikki B1 1A,1E,1D varianttisekvenssit, joiden linjatuista alueista mukaan 1A 002211.3

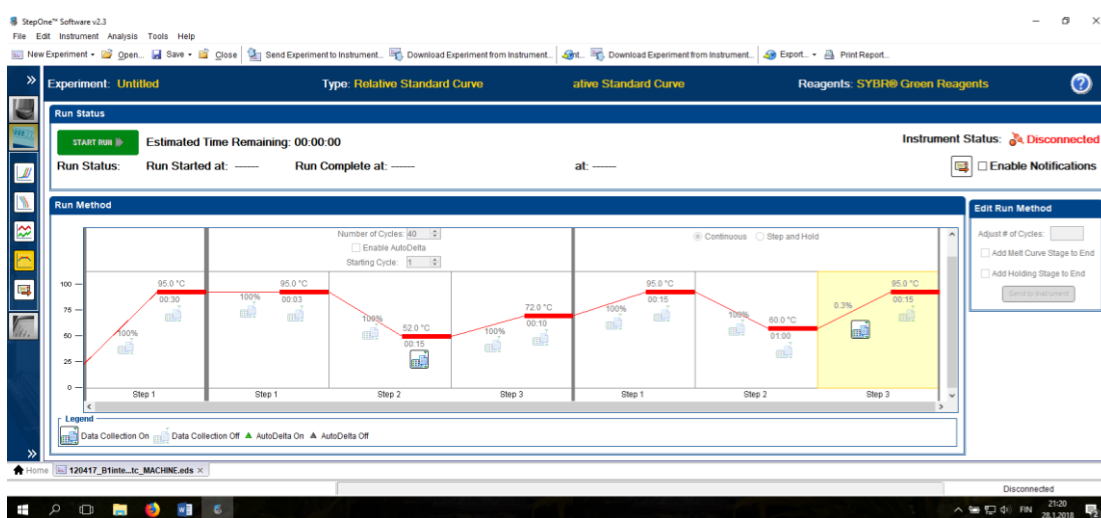
CAGGAACCCTTGCACAAGTGAACAGAACTGCACCAGCCCATTAGCTACAAAAATGTGCTCAGTCTTACTA
ATAAAGGAGAAGTATTTAATGAAGTTGTTGGAAAACAGCGCATATCTGGAAATTTGGATTCTCCAGAAGGT
GGTTTCGATGCCATCATGCAAGTTGCAGTTTGTGGATCACTGATTGGCTGGAGGAATGTTACACGGCTGCTG
GTGTTTTCCACAGATGCCGGGTTTCACTTTGCTGGAGATGGGAACTTGGTGGCATTGTTTTACCAAATGAT
GGACAATGTCACCTGGAAAATAATATGTACACAATGAGCCATTATTATGATTATCCTTCTATTGCTCACCTTGT
CCAGAACTGAGTGAAAATAATATTCAGACAATTTTTCAGTTACTGAAGAATTTTCAGCC



3. Työhön valitut alukkeet aikaansaatu kohdan 2 sekvenssillä ajettuna NCBI:n Primer-BLAST ohjelman tarkennetuilla ajoasetuksilla: pcr tuotekoko max. 200bp, BLAST odotettu e-arvo 100, BLAST sanakoko 10.

4. NCBI Primer-BLAST ohjelman ehdottamien alukevaihtoehtoista valittu alukepari:
(β 1 integriini, havaitaan 1A,1E,1D variantit): pari 10

FW: AGGAATGTTACACGGCTGCT
RW: CAATGCCAC-CAAGTTTCCCA



Ajon asetukset

1. +95C / 30s

1. +95C / 3s **40x sykliä**

2. +52C / 15s(datan keruu)

3. +72C / 10s

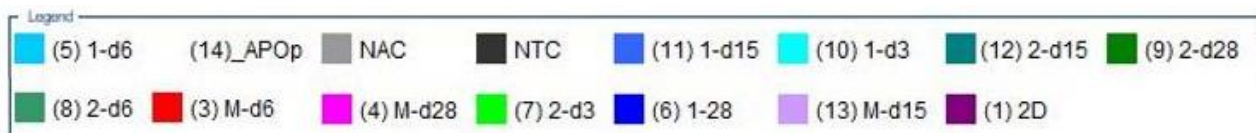
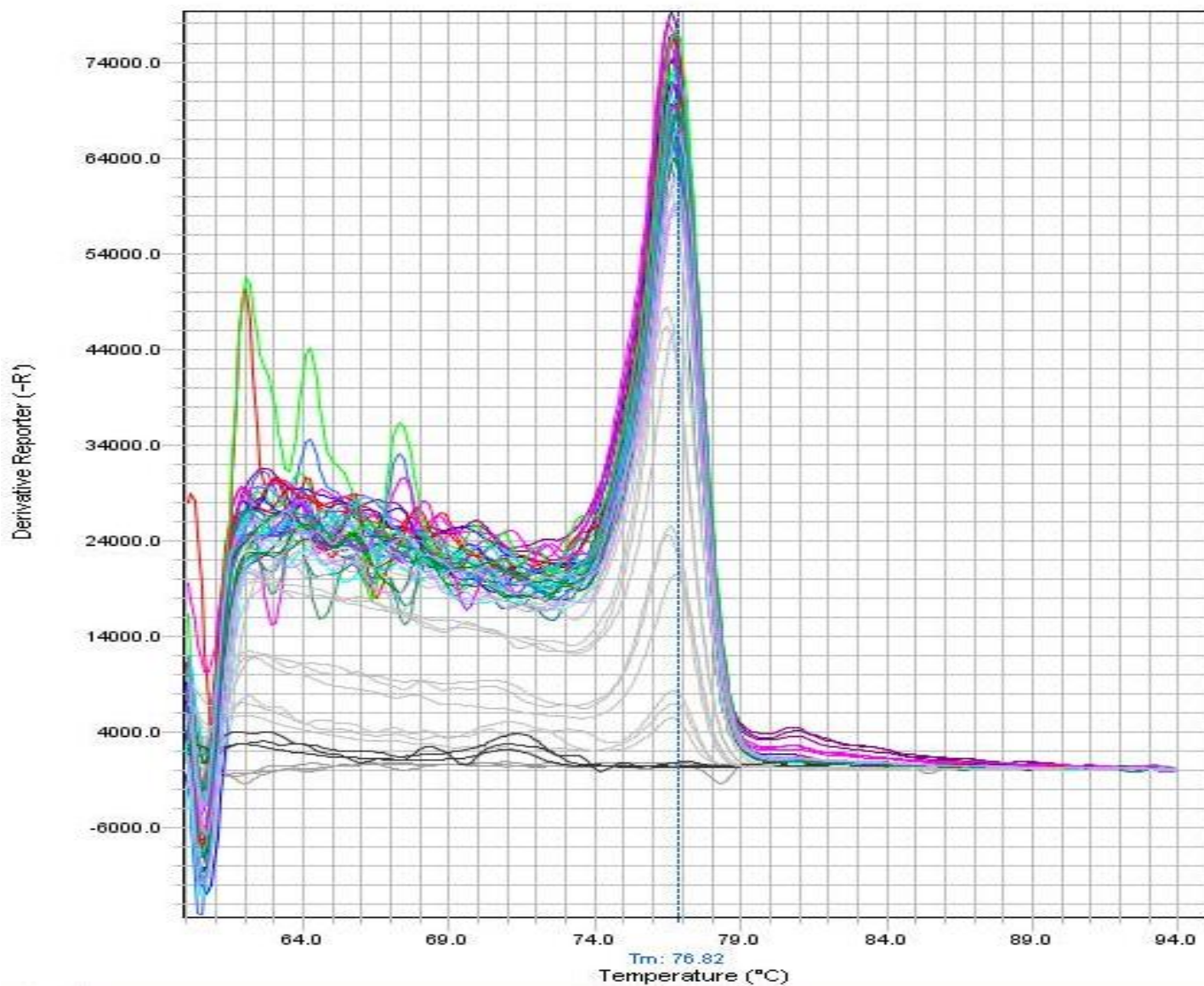
1. +95C / 15s

2. +60C / 60s

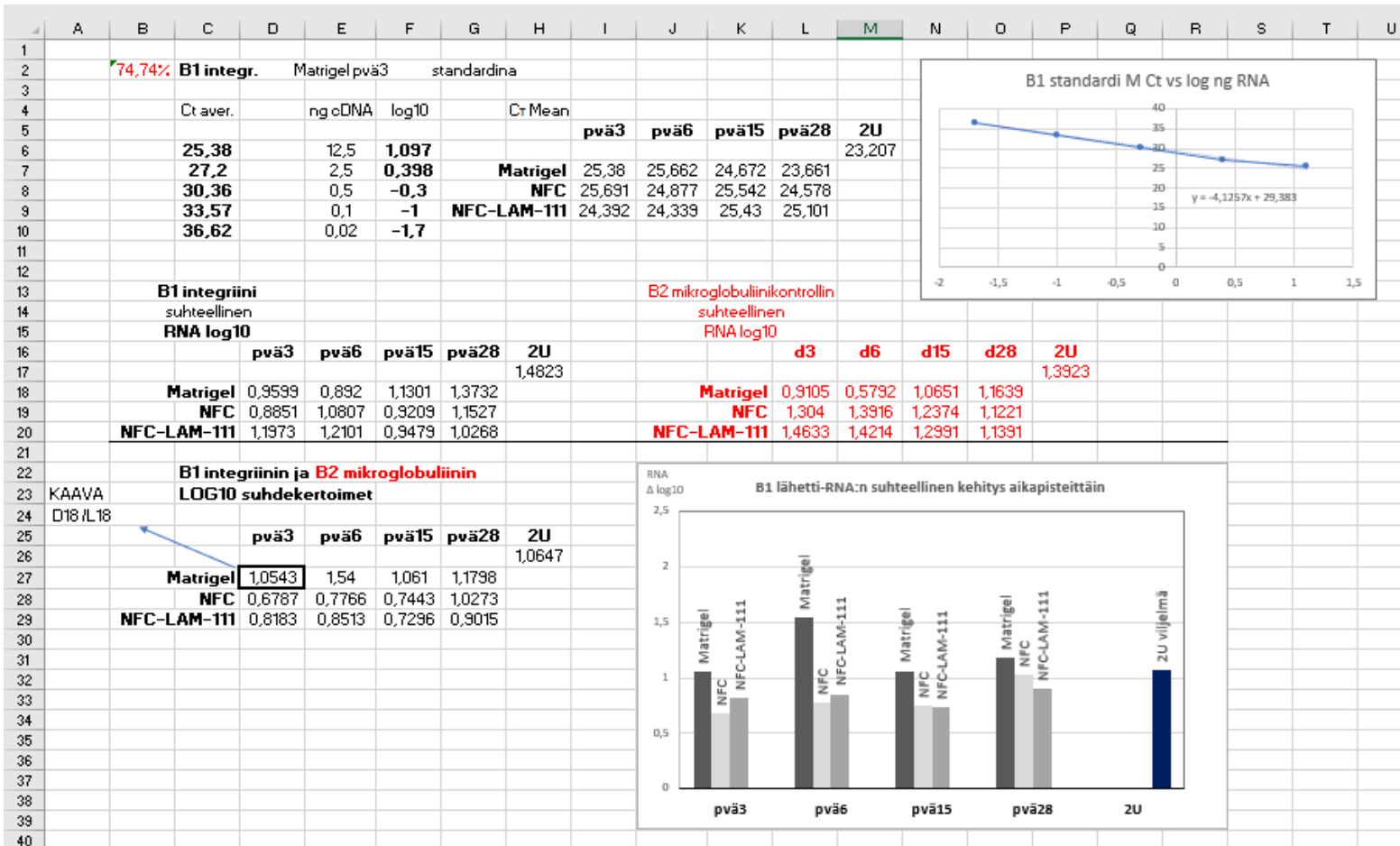
3. +95C / 15s(datan keruu)



Melt Curve



Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto



c-FLIP-L (CFLAR)

1. Näytteistä toivotaan havaittavan:

>NM_003879.6 Homo sapiens CASP8 and FADD like apoptosis regulator (CFLAR), transcript variant 1, mRNA,

>NM_001127183.3 Homo sapiens CASP8 and FADD like apoptosis regulator (CFLAR), transcript variant 2, mRNA

2. Yhtenevästi rajautunut ja alukkeiden suunnitteluun valittu sekvenssialue saatu asetuksilla: EMBL-EBI/MUSCLE: ClustalW strict, MSA;

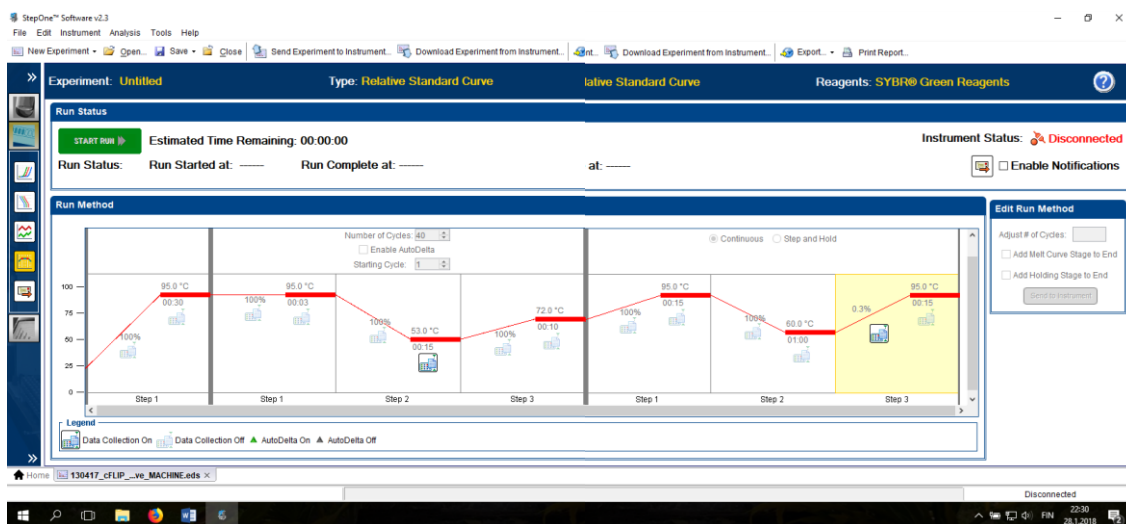
```
CAGAGCTTCTTCGAGACACCTTCACTTCCCTGGGCTATGAAGTCCAGAAATTCTTGCATC
TCAGTATGCATGGTATATCCCAGATTCTTGGCCAATTTGCCTGTATGCCCCGAGACCGAG
ACTACGACAGCTTTGTGTGTGTCTTGGTGAGCCGAGGAGGCTCCCAGAGTGTGTATGGTG
TGGATCAGACTCACTCAGGGCTCCCCCTGCATCACATCAGGAGGATGTTTCATGGGAGATT
CATGCCCTTATCTAGCAGGAAGCCAAAGATGTTTTTATTTCAGAACTATGTGGTGTCTAG
```



3. Työhön valitut alukkeiden etsiminen toistettiin kohdan 2 sekvenssillä ajettuna NCBI:n Primer-BLAST ohjelman tarkennetuilla ajoasetuksilla: per tuotekoko max. 100bp, BLAST odotettu e-arvo 100, BLAST sanakoko 10.

4. NCBI Primer-BLAST ohjelman ehdottamien alukevaihtoehtoja valittu alukepari: 6
c-FLIP(CFLAR)/ **c-FLIP-L** (havaitaan variantit 1,8,9,5,6,2,7,4)

FW: GCTTTGTGTGTGTCCTGGTG
RW: GGAGCCCTGAGTGAGTCTGA



Ajon asetukset

1. +95C / 30s

1. +95C / 3s **40x sykliä**

2. +53C / 15s(datan keruu)

3. +72C / 10s

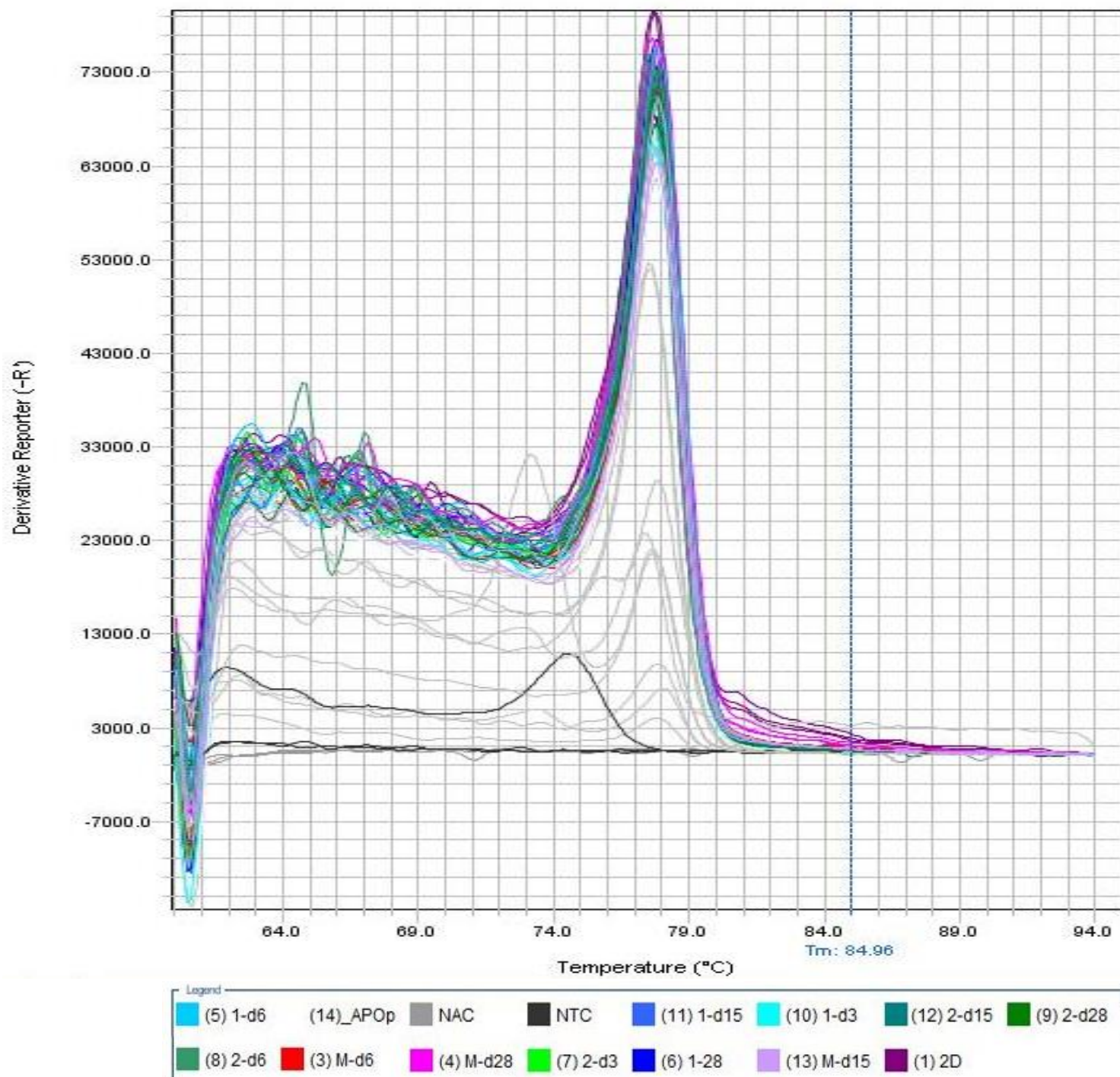
1. +95C / 15s

2. +60C / 60s

3. +95C / 15s(datan keruu)

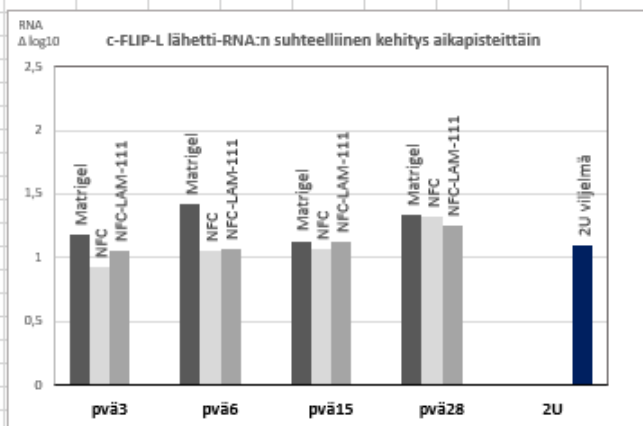
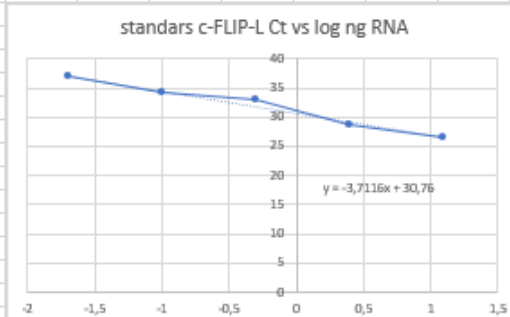


Melt Curve



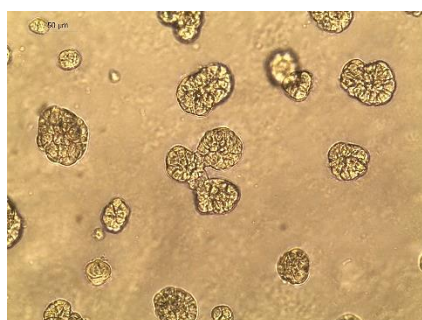
Perinnöllisyystiede – Farmaseuttiset biotieteet / Helsingin Yliopisto

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1																					
2																					
3		83.43%	c-FLIP-L	Matrigel pvä3 standardina				Cr Mean													
4																					
5			Ct average		ng cDNA	log10															
6																					
7			26,6247		12,5	1,09691															
8			28,7393		2,5	0,39794															
9			33,0143		0,5	-0,301															
10			34,0873		0,1	-1															
11			36,9223		0,02	-1,699															
12																					
13			c-FLIP-L																		
14			suhteellinen																		
15			RNA log10																		
16																					
17																					
18			Matrigel	1,07814	0,82142	1,2053	1,56004														
19			NFC	1,21085	1,46384	1,32454	1,48983														
20			NFC-LAM-111	1,53228	1,51982	1,45202	1,41989														
21																					
22			c-FLIP-L ja B2 mikroglobuliinin																		
23			LOG10 suhdekertoimet																		
24																					
25	KAAVA																				
26	C18/J18																				
27			Matrigel	1,18417	1,4182	1,13166	1,34037														
28			NFC	0,92855	1,05187	1,07046	1,32772														
29			NFC-LAM-111	1,04716	1,06922	1,11769	1,24653														
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					

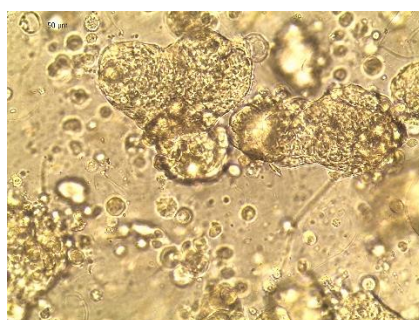


LIITE 4

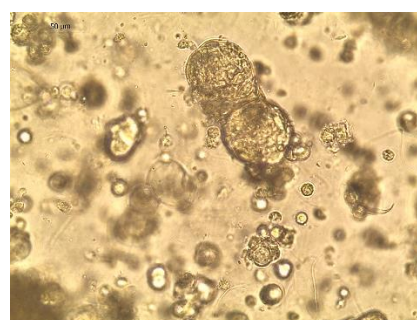
Monikystisiä sferoideja havaittiin kaikissa 3U viljelyolosuhteissa päivänä 28.



Matrigel™



NFC



NFC-LAM-111

LIITE 5

Julkaisuista lainattujen kuvien tekijänoikeudet

Kuva 1: Creative Commons Attribution 3.0 License

”Malgorzata Gajewska, Katarzyna Zielniok and Tomasz Motyl (2013). Autophagy in Development and Remodelling of Mammary Gland, Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?, Dr. Yannick Bailly (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54558. Available from: <https://mts.intechopen.com/books/autophagy-a-double-edged-sword-cell-survival-or-death-/autophagy-in-development-and-remodelling-of-mammary-gland> ”